

28,04
С. Примроуз Р. Тваймен

ГЕНОМИКА

РОЛЬ В МЕДИЦИНЕ



БИНОМ



ГЕНОМИКА

РОЛЬ В МЕДИЦИНЕ

GENOMICS

APPLICATIONS IN HUMAN BIOLOGY

Sandy B. Pritchard

Senior Lecturer in Human Genetics
Department of Human Genetics
University of Oxford, UK

Richard M. Maynard

Professor of Human Genetics
Department of Human Genetics
University of Oxford, UK



Oxford University Press

GENOMICS

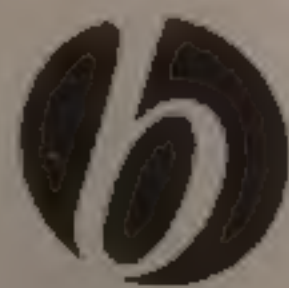
APPLICATIONS IN HUMAN BIOLOGY

Sandy B. Primrose

Senior Partner, Business & Technology Management,
High Wycombe, UK

Richard M. Twyman

Department of Biology, University of York, York, UK
Managing Director, Write Science, York, UK



**Blackwell
Publishing**

С. Примроуз Р. Тваймен

ГЕНОМИКА

РОЛЬ В МЕДИЦИНЕ

Перевод с английского
канд. хим. наук О. Н. Королевой

под редакцией
академика РАН и РАСХН
Е. Д. Свердлова
и проф., д-ра биол. наук
С. А. Лимборской

ПОДАШЕНО



Москва
БИНОМ. Лаборатория знаний
2008

УДК 577.21
ББК 28.04я73
П76

Примроуз С.

П75 Геномика. Роль в медицине / С. Примроуз, Р. Тваймен ; пер. с англ. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. — 277 с. : ил.
ISBN 978-5-94774-500-9 (русск.)
ISBN 1-4051-0819-3 (англ.)

В учебном издании обсуждается роль достижений биотехнологии, а также нового направления биологии — геномики — в развитии современной медицины. Рассмотрены подходы при крупномасштабных структурных и функциональных исследованиях полных геномов различных организмов. Представлены сведения об этиологии, патогенезе и диагностике инфекционных заболеваний, рассмотрены новые пути борьбы с бактериальными, вирусными, грибковыми и протозойными инфекциями. Изложены представления о молекулярных механизмах возникновения наследственных заболеваний и рака, описаны методы установления взаимосвязи между указанными заболеваниями и нарушениями в хромосомах и отдельных генах. Рассмотрены основные подходы к скринингу новых лекарственных препаратов, показан вклад геномики в развитие новых видов терапии.

Для студентов, изучающих молекулярную биологию, генную инженерию, геномику, молекулярную медицину, а также для научных работников.

УДК 577.21
ББК 28.04я73

Учебное издание

Примроуз Санди
Тваймен Ричард

ГЕНОМИКА. РОЛЬ В МЕДИЦИНЕ

Ведущий редактор канд. хим. наук *Т. И. Почкаева*

Редактор канд. биол. наук *В. В. Гейдебрехт*

Художник *Ф. Инфантэ*. Художественный редактор *О. Лапко*

Компьютерная верстка: *В. Верховин, Е. Голубова*

Подписано в печать 29.08.07. Формат 70×100/16.

Гарнитура NewtonC. Печать офсетная. Бумага офсетная № 1.

Усл. печ. л. 22,75. Тираж 1000 экз. Заказ 4569

БИНОМ. Лаборатория знаний 125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3

Телефон: (499) 157-5272

e-mail: Lbz@aha.ru, <http://www.Lbz.ru>

При участии ООО «ЭМПРЕЗА»

Отпечатано в ОАО «ИПК «Ульяновский Дом печати»
432980, г. Ульяновск, ул. Гончарова, 14

ISBN 978-5-94774-500-9 (русск.)
ISBN 1-4051-0819-3 (англ.)

99110-3

Централизованная
библиотечная
система № 2
СВАО г. Москвы

Издание опубликовано по договору с Blackwell Publishing Ltd, Oxford. Перевод осуществлен издательством «БИНОМ. Лаборатория знаний» с английского оригинала. Ответственность за адекватность перевода лежит на издательстве «БИНОМ. Лаборатория знаний», а не на издательстве Blackwell Publishing Ltd.
© 2004 by Blackwell Science Ltd, a Blackwell Publishing Company.
© Перевод на русский язык, оформление «БИНОМ. Лаборатория знаний», 2008

Оглавление

Предисловие редакторов русского издания	5
Предисловие	10
Благодарности	13
Глава 1. Биотехнология и геномика. Медицинский аспект	15
Введение	15
Технология рекомбинантных ДНК	16
Дополнение 1-1 Основные ферменты, используемые для манипуляций с ДНК	16
Метод молекулярного клонирования	17
Дополнение 1-2 Гель-электрофорез	20
Идентификация и клонирование специфических генов	20
Функциональная характеристика клонированных генов	23
Дополнение 1-3 Зонды для гибридизации на основе нуклеиновых кислот (НК-зонды для гибридизации)	24
От рекомбинантной ДНК к молекулярной медицине	26
Использование ДНК-последовательностей в качестве инструментов диагностики	26
Получение терапевтических белков	27
Генная медицина	31
Модели болезней	31
Влияние геномики на медицину	32
Новая молекулярная медицина	35
Об этой книге	36

Дополнительная литература	37
---------------------------------	----

Глава 2. Основные принципы геномики 38

Введение	38
----------------	----

Новые достижения: проект «Геном человека»	38
---	----

Дополнение 2-1 Что такое геномика?	39
--	----

Дополнение 2-2 Геномы модельных организмов как первоначальные задачи проекта «Геном человека»	40
---	----

Дополнение 2-3 Этические, юридические и социальные аспекты (ELSI) проекта «Геном человека»	40
--	----

Революция в генетическом картировании	42
---	----

Дополнение 2-4 Вариации в геноме человека	42
---	----

Революция в физическом картировании	45
---	----

Дополнение 2-5 Опорная STS-карта генома человека	48
--	----

Стратегия секвенирования	49
--------------------------------	----

Дополнение 2-6 «Черновые» варианты и окончательные последовательности	54
---	----

Аннотирование генома	54
----------------------------	----

Перспективы: функциональная геномика	57
--	----

Сравнение последовательностей. Сравнительная геномика	58
---	----

Дополнение 2-7 Стандартизованная структурная и функциональная классификация белков	60
--	----

Транскриптомика. Глобальный анализ мРНК	62
---	----

Дополнение 2-8 Производство точечных и олигонуклеотидных микрочипов	65
---	----

Протеомика. Глобальный анализ белков	69
--	----

Биотехнологические основы разделения протеомов	70
--	----

Дополнение 2-9 Белковые чипы	71
------------------------------------	----

Характеристика белков с помощью масс-спектрометрии	73
--	----

Применение экспрессионной протеомики	75
--	----

Биотехнологические основы протеомики взаимодействий	76
---	----

Мутационная геномика	80
----------------------------	----

Дополнительная литература	83
---------------------------------	----

Глава 3. Геномика и ее роль в лечении инфекционных заболеваний ... 85

Микроорганизмы, вызывающие заболевания	85
--	----

Откуда появляются новые болезни?	89
--	----

Идентификация возбудителей болезни	91
--	----

Дополнение 3-1 Средства биологической войны.	92
---	----

Дополнение 3-2 Типирование патогенов в судебной медицине	95
Молекулярная эпидемиология	95
Устойчивость организма-хозяина к инфекции	97
Понятие бактериальной патогенности	97
Островки патогенности	100
Сравнительная геномика и пластичность генома	100
Дополнение 3-3 Геномные вариации штаммов туберкулезной вакцины	102
Дополнение 3-4 Очерки истории происхождения метициллин-устойчивого штамма <i>Staphylococcus aureus</i> (метициллин-устойчивого золотистого стафилококка, MRSA) и эпидемия синдрома токсического шока	103
Борьба с инфекционными заболеваниями	104
Новые подходы к вакцинированию	104
Геномика и разработка новых антибактериальных препаратов	107
Борьба с грибковыми инфекциями	112
Успехи в лечении протозойных инфекций	112
Дополнение 3-5 Жизненный цикл малярийного паразита	114
Разработка противовирусных препаратов	116
Дополнение 3-6 Высокоактивная антивирусная терапия (ВААВТ, или англ. HAART) при лечении СПИДа	119
Дополнительная литература	120
Глава 4. Исследование и лечение генетических заболеваний	121
Типы генетических заболеваний	121
Диагностика моногенных болезней	122
Лечение моногенных болезней	128
Дополнение 4-1 Рибозимы	130
Поиск генов, ответственных за моногенные болезни, и выявление их функций	131
Позиционное клонирование	131
Метод генов-кандидатов	133
Дополнение 4-2 Последовательность генома мыши и ее значимость для изучения болезней человека	133
Анализ полигенных болезней	135
Безмодельный (непараметрический) анализ сцеплений	135
Дополнение 4-3 Связь между диабетом I типа и ГКГ	136
Картирование неравновесных сцеплений	137
Гаплотипы	138

Главный комплекс гистосовместимости	138
Индивидуальные реакции на лекарства (фармакогеномика)	141
Дополнение 4-4 Социальные и этические проблемы	143
Дополнительная литература	145
Глава 5. Диагностика и лечение рака	146
Введение	146
Молекулярные основы рака	147
Дополнение 5-1 Рак как эволюционный процесс	148
Дополнение 5-2 Молекулярный контроль клеточной пролиферации	151
Роль геномики в изучении рака	153
Новые методы диагностики рака	155
Новые подходы к лечению рака	158
Радиотерапия	159
Химиотерапия	160
Биотерапия	164
Новые терапевтические мишени	166
Дополнительная литература	168
Глава 6. Крупномасштабное производство биофармацевтических препаратов	169
Краткий обзор	169
Дополнение 6-1 Названия моноклональных антител	172
Производство моноклональных антител	172
Дополнение 6-2 Человеческие антитела, полученные с помощью фагового дисплея.	175
Радиоиммунотерапия и диагностическая визуализация	175
Другие модифицированные антитела	176
Крупномасштабное культивирование микроорганизмов	176
Крупномасштабное культивирование животных клеток	180
Дополнение 6-3 Иммortalизованные клетки в генетических исследованиях	181
Экспрессионные системы	184
Дальнейшие производственные процессы	186
Генетические манипуляции для облегчения процедур очистки биофармацевтических препаратов	189
Качество биофармацевтических препаратов	191

Дополнение 6-4 Использование лектиновых микрочипов для анализа гликозилирования биофармацевтических препаратов	193
Международный стандарт качества GMP	195
Дополнение 6-5. Термины, используемые при производстве биофармацевтических препаратов	196
Альтернативные системы производства	197
Дополнительная литература	198
 Глава 7. Геномика и создание новых лекарственных препаратов	199
Введение. Как разрабатывают лекарства?	199
Высокоэффективный скрининг	202
Дополнение 7-1 Сцинтилляционный анализ близкого расстояния	204
Подтверждение действенности препарата и животные модели	209
Дополнение 7-2 Примеры лекарственных мишеней, подтвержденных в нокаутных мышинных моделях	211
Комбинаторная химия	212
Динамические комбинаторные библиотеки	216
Виртуальный скрининг	217
Комбинаторный биосинтез и химический биосинтез	218
Метаболизм лекарств	221
Токсикогеномика	221
Дополнительная литература	223
 Глава 8. Генная и клеточная терапия	225
Введение	225
Дополнение 8-1 Этические аспекты применения генной терапии	226
Генная терапия	226
Пути доставки генов	228
Механизмы доставки генов	229
Дополнение 8-2 Свойства вирусных векторов для доставки генов	230
Примеры лечения заболеваний	234
Лекарства на основе нуклеиновых кислот	239
Антисмысловые препараты	240
Лекарства на основе рибозимов	240
Возможности малых интерферирующих РНК	241
Аптамеры	242
Генная терапия инфекционных заболеваний: ВИЧ	243

ДНК-вакцины	244
Модели болезней	245
Модели моногенных болезней	246
Дополнение 8-3 Перенос генов мышам	248
Модели комплексных болезней	250
Клеточная терапия	250
Стволовые клетки и клонирование	252
Дополнение 8-4 Этические аспекты клонирования человека	252
Трансплантация органов	253
Дополнительная литература	254
 Предметный указатель	 256
 Латинские названия и английские сокращения	 270

Предисловие редакторов русского издания

*Легко понять суть, не становясь
жертвой ситуации, когда
«за деревьями не видно леса».*

Мы живем в начале постгеномной эры биологических исследований — в то время, когда число установленных полных структур геномов стремительно растет, среди них — последовательности геномов множества бактерий, дрожжей, нематоды, дрозофилы, геномов человека и его ближайшего родственника шимпанзе и другие, которые либо уже установлены, либо будут установлены очень скоро. Все эти замечательные результаты можно обобщить следующим образом.

В прикладной области — развитие медицины нового поколения (генная терапия; фармакогеномика; лекарства нового поколения — эндогенные биорегуляторы, вакцины нового поколения, диагностика предрасположенности к болезням; судебная медицина — идентификация личности, появление надежных технологий экспресс-диагностики вновь появляющихся инфекций); новые подходы в сельском хозяйстве (диагностика болезней; идентификация генетических признаков пород и сортов для селекции; животные с улучшенными свойствами на основе рационально направленного изменения геномов); использование новых технологий для развития производства пищевых продуктов; использование новых технологий для контроля и улучшения экологической ситуации.

В фундаментальных исследованиях — идентификация всех генов; установление карты тканеспецифичности их экспрессии; идентификация регуляторных областей генов; построение глобальной регуляторной карты генома; классификация генов по биохимическим функциям их продуктов; идентификация всех потенциальных белков и доменов; анализ распределения полиморфизма и мутаций; определение эволюционных и популяционных взаимосвязей; создание коллекции генетического материала; и многое, многое другое...

Таким образом, употребляя здесь термин «постгеномная эра», мы выделяем во временной истории биологических исследований *две* эпохи: до массированного анализа структуры геномов, когда имели дело с отдельными биологическими молекулами, в том числе генами; и постгеномная (*новейшая*) эра, когда ученые оперируют с крупными массивами генов, пытаясь понять гармонию сложнейшей системы взаимодействий геномов, их продуктов, клеточных структур и систем сигнализации — всего, что позволяет живому ансамблю правильно ориентироваться в пространстве и во времени.

Нельзя сказать, что сейчас уже достигнуто очень хорошее понимание живых систем; впереди еще долгий путь познания, прежде чем биологическая материя откроется нам в деталях. Тем не менее можно уверенно утверждать, что наука нашла свою тропу в различные прикладные области; особенно ярко прогресс в научных исследованиях проявляется в медицине.

Как заметил Нобелевский лауреат Джим Уотсон, даже половины той информации, которую принесла расшифровка структуры генома человека, достаточно для того, чтобы все биофармацевтические фирмы мира были заняты на многие десятилетия (приводим высказывание в своем пересказе).

Темп накопления геномной информации сегодня так высок, и она приносит так много новых данных, что учебники часто не успевают за важными концептуальными изменениями в этой области. Молодое поколение будущих ученых — студенты — нуждаются в такой информации. Восполнить этот пробел помогают современные учебные пособия.

Несомненно, к числу таких полезных пособий относится предлагаемая вниманию читателей книга английских авторов. Санди Примроуз — представитель бизнес-сообщества, Ричард Тваймен — представитель университетской науки. Состав авторского коллектива отражает сегодняшний день в научных и околонуточных кругах: достижения геномики связаны с университетской и академической наукой, тогда как быстрое внедрение этих достижений в практику — заслуга хорошо ориентированного и информированного бизнеса.

Цель данной книги — дать широкую и всестороннюю оценку того, как технологии рекомбинантной ДНК и геномики используются в медицине. Книга охватывает широкий спектр применений современной геномики в различных областях медицины. Открывает книгу краткий обзор, сформулированные там темы детализируются в последующих главах. Далее изложены достаточно подробно и в простой доступной форме основные принципы геномики (гл. 2), что позволит читателю легче понять дальнейшее изложение. В последующих главах обсуждается роль рекомбинантной ДНК и геномики в диагностике, лечении и предотвращении инфекционных

заболеваний (гл. 3), наследственных заболеваний (гл. 4) и рака (гл. 5). Заключительные главы посвящены рассмотрению современных подходов к созданию лекарств и новых терапевтических методов, в том числе при решении проблем крупномасштабного производства биофармацевтических препаратов (гл. 6); разработке лекарств нового поколения (гл. 7), где в качестве активного начала используются собственные биорегуляторы человеческого организма, нацеленные на конкретные молекулярные мишени в организме; в последней главе (гл. 8) дано краткое описание современных методов медицины — генной и клеточной терапии, которые, безусловно, были бы невозможны без предварительно накопленной и осмысленной геномной информации. И хотя многие медицинские подходы — дело будущего, но мне представляется, что это будущее уже на горизонте.

Весьма полезна дополнительная литература в конце каждой главы.

Мы считаем, что особый интерес читателя вызовут две темы, освещаемые в этой книге.

При изложении основных принципов геномики (гл. 2) существенно, что авторы уделили серьезное внимание принципам генетического картирования, включая создание генетических карт, основанных на новом поколении полиморфных молекулярно-генетических маркеров. При этом прослеживается, каким образом поток геномной информации, который начинается с анализа генетических карт, получаемых генетическими методами, переходит на физические карты, где используются новые концепции физического картирования, такие как создание STS, благодаря чему в конечном счете достигается локализация области с мутацией, приводящей к превращению нормального (здорового) гена организма в ген, функции которого нарушены (вследствие чего и возникает болезнь). Далее, благодаря доступности клонированных фрагментов генома достаточно просто можно перейти от карт к физическим носителям генетического материала — длинным фрагментам ДНК, клонированным в подходящие векторы, и, наконец, к выявлению самого гена. Последующее изложение представлений о современных подходах к определению нуклеотидной последовательности генома и его вариабельности способствует созданию у читателя вполне целостной, хотя и сжатой, картины современной геномики, апофеозом которой является *сравнительная геномика*, которая позволяет получать богатейшую функциональную и эволюционную информацию путем сравнения структур множества секвенированных геномов.

Показано, насколько важную роль в генетическом анализе играют компьютерные технологии, которые дают возможность оперировать громадной информацией, непрерывно поступающей в банки данных в результате картирования, секвенирования геномов и определения продуктов их функционирования — транскриптомов и протеомов. На творческом симбиозе компьютерных технологий и экспериментальных методов

геномного анализа возникла новая важнейшая наука *биоинформатика* как часть современной геномики.

При изложении проблем крупномасштабного производства биофармацевтических препаратов (гл. 6) нам предложен объективный анализ современной ситуации в этой области. За короткий срок биотехнологические методы привели в медицинскую практику лекарства нового поколения, сделав их доступными широкому кругу пациентов. Из таких важнейших биопродуктов можно назвать интерферон, инсулин, гормон роста, тканевой активатор плазминогена и другие прямо-таки чудодейственные средства современной медицины, которые позволили успешно лечить ранее неизлечимые болезни. Этот жизненно значимый аспект фармации достаточно хорошо известен даже в не слишком научных кругах. Гораздо хуже мы ознакомлены с тем, как «устроено» производство этих продуктов сегодня.

Я почти уверен, что далекий от этой проблемы читатель все еще полагает, что дело здесь обстоит все еще так, как это делалось двадцать лет назад: происходит клонирование гена с последующей его экспрессией в бактериальных или дрожжевых клетках. В книге не отрицается, что, конечно же, эта «привычная» технология еще работает и в современных производствах, принося на рынок заметную долю фармацевтического продукта. Однако авторы также описывают технологии получения белковых препаратов в клетках млекопитающих; эти новые методы занимают в современном производстве не менее 60% и позволяют получать физиологически активные белки человека, гораздо более близкие к природным, чем белки, получаемые в бактериях. Эти *стратегические изменения производственной сферы* во многом прошли незамеченными научным сообществом.

При подготовке русской версии книги мы считали правильным сохранять терминологию авторов, которая, как правило, должна быть понятной нашему читателю. Книга адресована читателям, имеющим базовые знания в области генетики и молекулярной биологии. Поэтому здесь вы не найдете традиционного учебного материала относительно структуры генов, их экспрессии и другие подобные вещи, хорошо известные из учебников по молекулярной биологии, генетике и биохимии. Издержки из-за сжатости изложения компенсируются тем, что книга содержит специальные «вставки» (дополнения), посвященные происхождению и развитию конкретных технологий или методов лечения. В этих дополнениях более детально описываются молекулярные основы возникновения заболеваний или их лечения, а также обсуждаются этические проблемы применения новых технологий и терапевтических подходов.

Тем не менее нельзя удержаться от критики некоторых слишком смелых заключений, содержащихся в книге. Например авторы, утверждают, что позиционное клонирование теперь излишне, поскольку «как только ген болезни картирован в определенном районе генома, сразу можно

внимательно обследовать транскрипционную карту с целью обнаружения в этом районе генов-кандидатов для выявления их связи с болезнью». Это было бы так, если бы мы действительно знали о генах все. Но по мере развития геномики выявляются все новые гены, в особенности гены, не кодирующие белки. Они не входят в традиционные карты транскриптов. И единственный путь выявления их функций — получение мутантов и их идентификация генетическими методами, включающими позиционное или ассоциативное картирование.

Полагаем, что книга, несомненно, будет полезна студентам старших курсов и аспирантам биологических и медицинских специальностей, преподавателям, а также научным работникам работающим в области биомедицинских исследований.

*академик РАН и РАСХН Е. Д. Свердлов,
научный руководитель Института
молекулярной генетики РАН*

профессор, д-р биол. наук С. А. Лимборская

Предисловие

Почти 50 лет назад Уотсон и Крик подробно описали структуру ДНК и показали, как она может точно копироваться при передаче из поколения в поколение. В то время значение этого открытия для медицины только обсуждалось. Биологам прежде всего хотелось понять, как построены гены, и расшифровать генетический код. Приблизительно 25 лет назад началась биотехнологическая революция как результат развития технологии рекомбинантных ДНК, позволившей получать человеческие белки *in vitro* в больших количествах. Первоначально под термином «биотехнология» подразумевалось производство рекомбинантных молекул, а фармацевтическая биотехнология была очень узким направлением.

Сегодня мы являемся свидетелями революции в области геномных исследований, проводимых в рамках международных проектов, направленных на определение нуклеотидных последовательностей (секвенирование) полных геномов организмов — от бактерий до млекопитающих, включая человека. Идентифицированы многие гены из различных организмов и достигнут значительный прогресс в понимании роли этих генов в организме и при возникновении заболеваний. Уже практически нет таких областей медицины и фармакологии, которые не были бы затронуты данными исследованиями. Сейчас хорошо известно, какие гены обуславливают патогенность микроорганизмов; эти знания позволяют разрабатывать новые методы диагностики и создавать новые вакцины и антибиотики. Наблюдается значительный прогресс в понимании генетических основ наследственных заболеваний и рака, что также способствует развитию новых методов диагностики и лечения. Разработке новых фармацевтических препаратов способствует внедрение новых методологий скрининга, которые в свою очередь основаны на технологии рекомбинантных ДНК и достижениях геномики.

Еще совсем недавно, когда Уотсон и Крик обнародовали свое важное открытие, почти все лекарственные средства представляли собой небольшие молекулы; исключение составлял только инсулин. С появлением же технологии рекомбинантных ДНК список лекарств существенно расширился и сейчас охватывает широкий набор природных белков человека, включая

интерфероны, компоненты крови и гормоны. Многообразие лекарственных препаратов продолжает быстро увеличиваться и включает полученные генно-инженерными методами белки, которые не похожи на природные антитела человека и даже природные нуклеиновые кислоты. Более того, развиваются новые медицинские технологии, такие как генная терапия, клеточная терапия и тканевая терапия.

Итак, развитие упомянутых выше новых научных направлений происходит с огромной скоростью, поэтому неудивительно, что студенты и их научные наставники испытывают затруднения в формировании цельной картины происходящего. Эта книга адресована тем, кто хочет получить общее представление о современном состоянии биотехнологических разработок, областях их применения и, при необходимости, этические «подсказки». Книгу условно можно разделить на три части. В гл. 1 и 2 дается представление о роли биотехнологии и геномики в медицине; при этом особое внимание уделяется достижениям, которые легли в основу недавних успехов в области медицины. В гл. 3–5 детально рассматриваются возможности биотехнологии и геномики в предотвращении и лечении различных типов болезней. И наконец, в гл. 6–8 описывается вклад биотехнологии и геномики в развитие различных методов терапии, включая те, что основаны на использовании традиционных лекарств, рекомбинантных белков, а также генную и клеточную терапию.

При обсуждении любой затронутой в книге проблемы уровень детализации материала таков, что читатель легко может понять ее суть, не становясь жертвой ситуации, когда «за деревьями не видно леса». Мы исходили из предположения, что читатель имеет базовые знания в области генетики и молекулярной биологии, поэтому в книгу не включены главы, посвященные структуре ДНК, экспрессии генов и т. д., которые обычно присутствуют в других вполне успешных учебниках по биологии. Читатели, желающие более глубоко вникнуть в технологии рекомбинантных ДНК и геномики, могут обратиться к следующим учебникам: *Principles of Gene Manipulation* (POGM) и *Principles of Genome Analysis and Genomics* (POGA), выпущенным также издательством Blackwell Publishing. В конце каждой главы приведены ссылки на соответствующие главы из этих двух изданий (при этом использованы сокращения, приведенные выше), а также на наиболее подходящие обзорные статьи, отличающиеся наибольшей ясностью изложения. Кроме того, книга содержит специальные разделы (дополнения), посвященные происхождению и развитию конкретных технологий или методов лечения. В этих дополнениях более детально описываются молекулярные основы возникновения заболеваний или их лечения, а также обсуждаются этические проблемы применения новых технологий и терапевтических подходов.

Авторы выражают благодарность всем, кто оказал неоценимую помощь в подготовке рукописи, особенно Сью Годдард и ее коллегам (библиотека CAMR) и Элистер Фиттер (биологический факультет Йоркского университета). Ричард Тваймен хотел бы посвятить эту книгу своим родителям Питеру и Ирен, детям Эмили и Люси, а также Ханне, Джошуа и Дилану.

Санди Б. Примроуз и Ричард М. Тваймен

Литература

Primrose SB, Twyman RM (2003) *Principles of Genome Analysis and Genomics*, 3rd edn. Blackwell Publishing, Oxford.

Primrose SB, Twyman RM, Old RW (2001) *Principles of Gene Manipulation*, 6th edn. Blackwell Science, Oxford.

Благодарности

Некоторые рисунки и таблицы были взяты из других изданий. Мы выражаем благодарность всем авторам и издателям, позволившим использовать их данные.

Большая часть рисунков взята из следующих книг:

Primrose SB, (1991) *Molecular Biotechnology*, 2nd edn. Blackwell Publishing, Oxford.

Primrose SB, Twyman RM (2003) *Principles of Genome Analysis and Genomics*, 3rd edn. Blackwell Publishing, Oxford.

Primrose SB, Twyman RM, Old RW (2001) *Principles of Gene Manipulation*, 6th edn. Blackwell Science, Oxford.

Указанные ниже таблицы и рисунки взяты из следующих источников:

Рис. 2-4: Coulson A, Sulston J, Brenner S *et al.* (1986) Toward a physical map of the genome of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 7821–7825.

Рис. 2-8: EnSEMBL human genome browser www.ensembl.org

Рис. 2-9: Veculescu VE *et al.* (1997) Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* **88**, 243–251.

Рис. 2-12 inset: Gorg A, Postel W, Baumer M, Weiss W (1992) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, with immobilized pH gradients in the first dimension, of barley seed proteins: discrimination of cultivars with different mating grades. *Electrophoresis* **13**, 192–203.

Рис. 3-4: Courtesy of Catherine Arnold, UK Health Protection Agency.

Рис. B3-3: *Behretal.* (1999) *Science* **284**, 1520–1523. [for Box 3.3]

Рис. 4-4: Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF (2001) *Genetics in Medicine*, WB Saunders, Philadelphia, figure 4.14. Original photograph courtesy of P. Wray, Hospital for Sick Children, Toronto.

Рис. 4-6: Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF (2001) *Genetics in Medicine*, WB Saunders, Philadelphia

Рис. 4-7: Thomson G (2001) Mapping of disease loci. In: Kalow W, Meyer UA, Tyndale R, eds. *Pharmacogenomics*, pp 337–361. Marcel Dekker, New York.

Рис. 4-9: Judson R, Stephens JC, Windemuth A (2000) The predictive power of haplotypes in clinical response. *Pharmacogenomics* **1**, 15–26.

Рис. 4-10: Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF (2001) *Genetics in Medicine*, WB Saunders, Philadelphia, figure 4.13.

Рис. 4-11: Johnson JA, Evans WE (2002) Molecular diagnostics as a predictive tool: genetics of drug efficacy and toxicity. *Trends Mol Med* **8**, 300–305.

Рис. 5-6: Funaro A, Hovenstein AL, Santoro P *et al* (2000) Monoclonal antibodies and therapy of human cancers. *Biotechnol Adv* **18**, 385–401, figure 2.

Рис. В6-46: Procognia Ltd.

Рис. 7-4: Croston GE (2002) Functional cell-based uHTS in chemical genomic drug discovery. *Trends Biotechnol* **20**, 110–115, figure 2.

Рис. 7-5: Bandara, Kennedy (2002) *Drug Discovery Today* **7**, 411–418, figure 2.

Рис. 7-7: Thompson, Ellman (1996) *Chem Rev* **96**, 555, figure 10.29.

Рис. 7-8: Balkenhol F, von dem Bussche-Hunnefeld C, Lansky A *et al.* (1996) *Angew Chem Int Ed Engl* **35**, 2289, figure 10.30.

Рис. 7-12: Castle AL, Carver MP, Mendrick DL (2002) Toxicogenomics: a new revolution in drug safety. *Drug Discovery Today* **7**, 728–736, figure 4a

Табл. 7-1: Croston GE (2002) Functional cell-based uHTS in chemical genomic drug discovery. *Trends Biotechnol* **20**, 110–115.

Табл. 7-2: DeVito JA *et al.* (2002) An array of target-specific screening strains for antibacterial discovery. *Nature Biotechnol* **20**, 478–483.

Биотехнология и геномика. Медицинский аспект

Введение

За последние 300 лет достигнут значительный прогресс в понимании особенностей функционирования человеческого организма, как в норме, так и в патологии. Однако наши знания накапливались неравномерно. Из истории медицины известно немало неожиданных и революционных открытий. И лишь немногие из этих достижений были бы возможны без развития экспериментальных методов.

Рассмотрим в качестве примера открытие Александром Флемингом двух первых антимикробных препаратов: лизоцима (1922 г.) и пенициллина (1928 г.). Оба открытия были сделаны благодаря счастливой случайности, причем ни одно из них не было бы возможным, если бы Флеминг не умел культивировать бактерии на твердой питательной среде. Использование агара для этих целей, первоначально предложенное Фанни Хесс, было введено в практику Робертом Кохом в 1882 г. Вооруженные таким методом чистых культур Роберт Кох и Луи Пастер смогли установить принципы патогенности бактерий, основав тем самым новую дисциплину — медицинскую микробиологию. В свою очередь работы Флеминга, Пастера и Коха опираются на открытие бактерий Антони ван Левенгуком в 1683 г., а это не было бы возможным без изобретения микроскопа. Хотя ван Левенгук сконструировал свои собственные варианты микроскопа, однако честь этого изобретения принадлежит братьям Гансу и Захариасу Янсенам (1595 г.). Аналогичным образом, использование диэтилового эфира в качестве анестетика, впервые продемонстрированное Кроуфордом Лонгом* в 1842 г., было бы невозможным, если бы к этому времени не был известен метод синтеза эфира, который был впервые описан немецким ученым Валериусом Кордусом в 1540 г. Таким образом, «прорывы» в медицине неизменно связаны с технологическими достижениями физики, химии и биологии.

С 1970 г. мы стали свидетелями беспрецедентного числа медицинских инноваций, отражающих наше растущее понимание молекулярных основ

* Кроуфорд Лонг первым продемонстрировал возможность использования эфира в качестве анестетика, хотя эту заслугу часто приписывают Вильяму Мортону, который первым опубликовал этот метод в 1846 г.

существования здорового организма и возникновения заболеваний. Несмотря на огромную роль достижений химии и физики большинство медицинских нововведений все же являются прямым следствием двух технологических революций в биологии — революционной технологии **рекомбинантных ДНК** и **геномной** революции, которые и будут предметом обсуждения в данной книге. В гл. 1 мы коротко суммируем влияние технологий рекомбинантных ДНК и геномики на медицинскую практику. В последующих главах мы обсудим роль этих методов в предупреждении, диагностике и лечении различных типов заболеваний и рассмотрим технологические подходы, находящиеся на стадии разработки, которые могут повлиять на развитие медицины в будущем.

Технология рекомбинантных ДНК

Революционное открытие технологии рекомбинантных ДНК произошло примерно в 1972 г., когда были разработаны соответствующий инструментарий и методы манипуляции с ДНК *in vitro*. До 1970 г. были неизвестны удобные и правильные методы работы с ДНК; это означало, что нельзя было исследовать индивидуальные гены непосредственно. Методы генетического анализа могли быть использованы для непрямого изучения структуры и функции генов в модельных организмах, однако они не могли быть легко приложимы к человеку. Технология рекомбинантных ДНК стала возможной в результате выделения и биохимической характеристики ферментов, которые бактерии используют для манипуляций с ДНК в процессе своей нормальной жизнедеятельности (дополнение 1-1). Очень скоро стало

Дополнение 1-1 Основные ферменты, используемые для манипуляций с ДНК

- **Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы).** Это бактериальные ферменты, которые расщепляют молекулы ДНК внутри участков с определенной последовательностью, что позволяет делить большие молекулы ДНК на заранее известные фрагменты. Фермент расщепляет обе цепи ДНК, причем одноцепочечные разрывы могут располагаться точно друг против друга (образуются «тупые» концы) или с некоторым смещением друг относительно друга (образуются «липкие» концы).

- **ДНК-лигазы.** Это ферменты, которые соединяют ковалентно (лигируют) фрагменты ДНК. Некоторые из них могут соединять тупые концы, а другие — только

липкие. Совместимость перекрывающихся фрагментов зависит от используемых эндонуклеаз рестрикции.

- **ДНК-полимеразы.** Это ферменты, которые синтезируют ДНК на матрице в соответствии с принципом комплементарности. Для мечения ДНК, секвенирования ДНК, полимеразной цепной реакции и обратной транскрипции мРНК в кДНК используются различные ДНК-полимеразы.

- **Ферменты, модифицирующие ДНК.** В качестве примеров можно привести: щелочную фосфатазу (удаляет фосфатные группы с концов фрагментов ДНК) и полинуклеотидкиназу (катализирует обратный процесс). Эти ферменты используются для регулирования реакций лигирования и для мечения ДНК.

ясно, что если эти ферменты выделить в чистом виде, то их можно использовать для создания новых комбинаций различных фрагментов ДНК *in vitro*. Такие новые фрагменты называли **рекомбинатными молекулами ДНК**.

Метод молекулярного клонирования

Для экспериментов с определенной последовательностью ДНК необходимо получить достаточное количество ее копий. Первым существенным достижением в области технологии рекомбинантных ДНК стал метод получения миллионов копий с одной и той же последовательности ДНК — метод, известный как **молекулярное клонирование**. Исследователи уже давно знали о существовании в бактериях генетических элементов — плазмид и бактериофагов (фагов), способных к автономной репликации с образованием большого числа копий (**автономные репликоны**). Технология рекомбинантных ДНК дала возможность присоединять такие репликоны к последовательностям ДНК человека, которые таким образом можно было **амплифицировать**. Это привело к созданию на основе ДНК плазмид, фагов или (в некоторых случаях) их комбинаций **клонировующих векторов**, которые были предназначены для клонирования фрагментов чужеродной ДНК. Общая схема метода молекулярного клонирования показана на рис. 1-1.

В середине 1980-х годов был разработан другой метод амплификации ДНК *in vitro* с использованием очищенных препаратов ДНК-полимераз, известный как **полимеразная цепная реакция (ПЦР)**. Принцип ПЦР приведен на рис. 1-2. Для этого метода требовались праймеры — одноцепочечные молекулы ДНК, которые связываются с определенными участками ДНК-матрицы. Если два праймера выбраны таким образом, что они фланкируют интересующий район, связываясь с противоположными цепями ДНК навстречу друг другу, то синтез ДНК, направляемый этими праймерами, приведет к удвоению количества матрицы. Следовательно, циклическое повторение стадий **денатурации** (разделения матричной ДНК на отдельные цепи), **связывания (отжига) праймеров** и **удлинения праймеров** при синтезе ДНК может привести к экспоненциальному росту числа копий интересующей последовательности ДНК. По сравнению с традиционным клонированием ДНК в клетках, ПЦР — очень быстрый, чувствительный и производительный метод. Его можно использовать для получения больших количеств специфических фрагментов ДНК, исходя из очень малых количеств исходного материала, причем не обязательно хорошо сохранившегося. Например, ДНК может быть извлечена и амплифицирована из фиксированных биологических образцов, крови и спермы, найденных на месте преступления, и даже из костей неандертальцев! Однако копирование с помощью ПЦР в целом менее точное, чем клонирование в клетках, потому что ДНК-полимеразы, используемые в этой процедуре, имеют склонность к ошибкам. Стандартный метод ПЦР пригоден для амплификации фрагментов длиной только до 5 тыс. п. н., в то время как специальные векторы для клонирования позволяют умножать фрагменты ДНК длиной несколько сотен тыс. п. н. Следовательно, клониро-

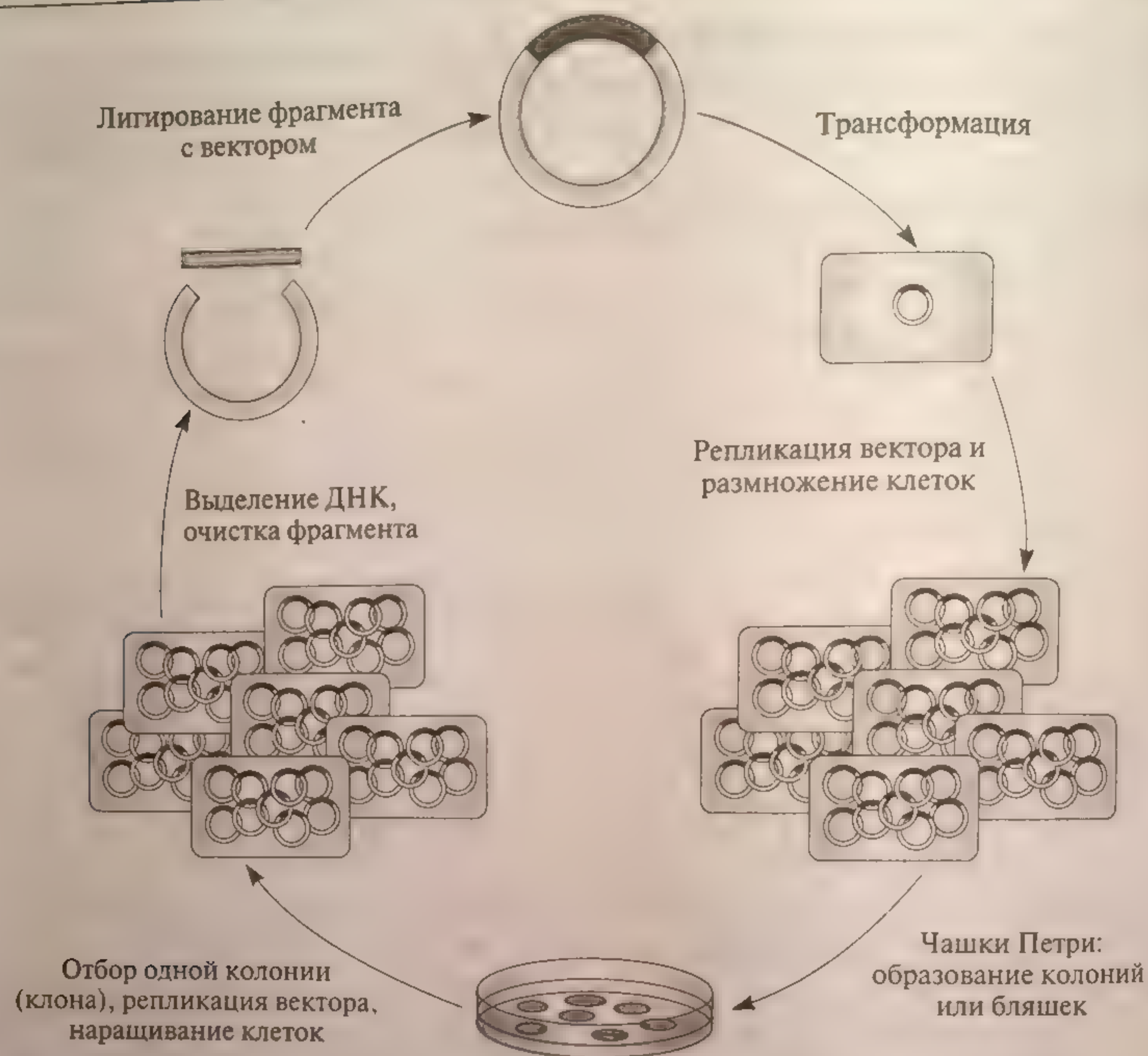


Рис. 1-1 Принципиальная схема молекулярного клонирования в клетках с использованием плазмидных векторов. Вектор расщепляют эндонуклеазой рестрикции по уникальному сайту узнавания. ДНК-вставку, полученную с использованием той же рестриктазы, соединяют с вектором с помощью ДНК-лигазы. Затем вектор, содержащий вставку, вводится в клетки бактерии *Escherichia coli* методом трансформации. Вектор содержит селективируемый маркерный ген (см. с. 232), обеспечивающий выживание и размножение в присутствии антибиотика только трансформированных, а не нормальных бактерий. При высевании бактерий на чашку Петри со средой трансформанты образуют колонии, содержащие около $1 \cdot 10^6$ клеток, причем каждая клетка содержит несколько сотен копий плазмиды. Индивидуальные колонии отбирают и выращивают в больших объемах культуральной среды в селективирующих условиях для дальнейшего выделения больших количеств ДНК. Амплифицированная в составе вектора ДНК-вставка может быть теперь вырезана с помощью того же фермента рестрикции, который был использован при встраивании ее в вектор.

вание в клетках и ПЦР имеют взаимно дополняющее, хотя и перекрывающееся применение в молекулярной биологии человека.

Оба рассмотренных подхода нуждаются в методах детекции для слежения за протеканием реакции и анализа продуктов. Как правило, для этих целей используют **гель-электрофорез**, который позволяет разделять молекулы ДНК по размеру (дополнение 1-2).

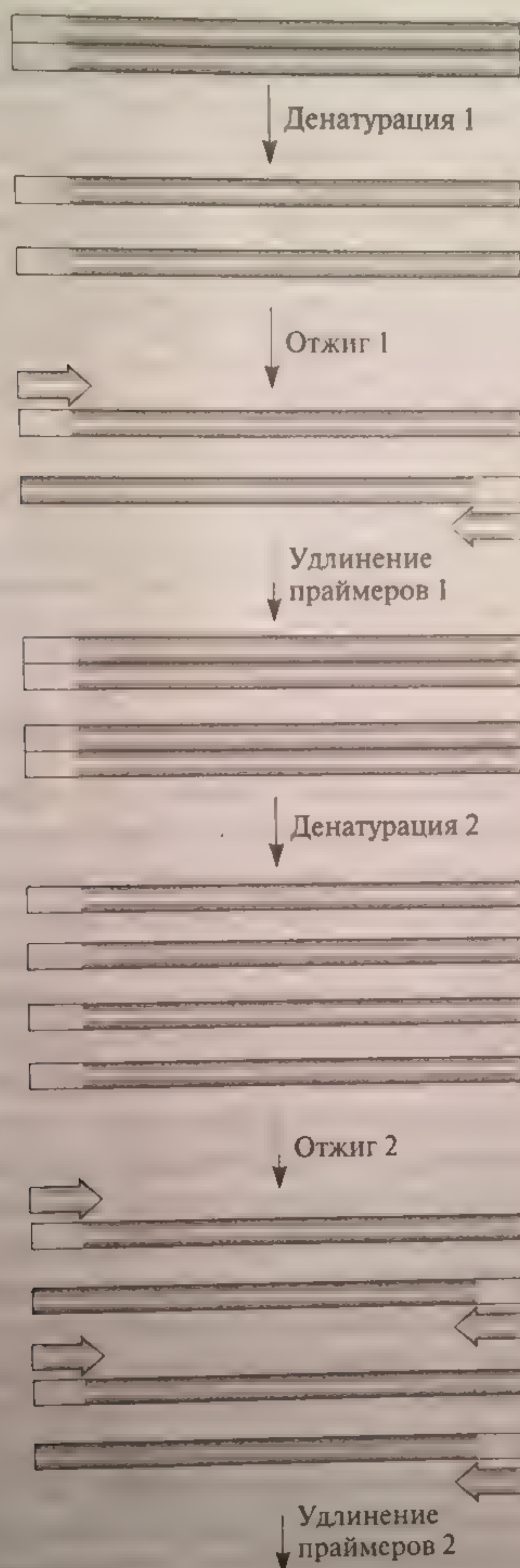


Рис. 1-2 Принцип полимеразной цепной реакции. Двухцепочечную ДНК-матрицу денатурируют (разделяют на отдельные цепи), и проводят отжиг с двумя праймерами. Праймеры присоединяются к противоположным цепям навстречу друг другу, определяя границы целевого амплифицируемого фрагмента. В процессе достройки праймеров происходит копирование участка ДНК, расположенного между двумя праймерами, и в результате количество матрицы удваивается. Цикл реакций денатурации матрицы, отжига и удлинения праймеров повторяется 25–30 раз. При избытке праймеров и других компонентов реакции после 25 циклов теоретически может получиться более 8 млн копий фрагмента.

Деление ДНК-фрагментов

Гель-электрофорез — стандартный метод разделения смеси молекул ДНК по размеру. Он основан на том, что молекулы ДНК в растворе заряжены отрицательно и под действием электрического поля движутся к аноду. Если электрофорез проводится в агарозном или полиакриламидном геле, то поры геля обладают эффектом сита, и в результате малые молекулы движутся к аноду быстрее, чем большие. Разделяющая способность геля зависит от размера пор, который в свою очередь зависит от концентрации геля. Например, 5%-й агарозный гель позволяет фракционировать молекулы ДНК размером 100–500 п. н., в то время как в

0,5%-м геле можно разделять молекулы размером 5–20 тыс. п. н. Полиакриламидные гели используются для фракционирования фрагментов ДНК меньшего размера, а также (при необходимости) различающихся между собой на один нуклеотид (например, при секвенировании ДНК). Положение отдельных молекул ДНК при электрофорезе в агарозных гелях выявляют с помощью интеркалирующего красителя этидийбромида, а при разделении в полиакриламидном геле ДНК предварительно метят. Для разделения молекул длиной более 50 тыс. п. н. используют специальный метод — гель-электрофорез в пульсирующем поле.

Идентификация и клонирование специфических генов

Прежде чем клонировать специфическую генную последовательность, ее необходимо выделить из природных источников, и это, как правило, узкое место в любом эксперименте по клонированию. Два основных источника ДНК для клонирования — геномная ДНК и комплементарная ДНК (кДНК) — невероятно сложны (табл. 1-1). Поэтому индивидуальные гены «разбавлены» миллионами не относящихся к ним фрагментов ДНК.

В некоторых редких случаях удавалось достаточно просто получить необходимую последовательность. Например, в числе первых клонированных генов человека были гены, кодирующие α -глобин и β -глобин, поскольку ретикулоциты (незрелые красные кровяные клетки) содержат настолько много соответствующей мРНК, что получить нужные последовательности кДНК можно было в результате секвенирования плазмид из случайно выбранных клонов. Однако генов, которые относятся к категории «представленных в избытке», не очень много, поэтому чаще всего приходится искать более сложные подходы.

При молекулярном клонировании в клетках в качестве общего подхода предполагается создание **библиотеки ДНК**, в которой представлена полная коллекция клонированных фрагментов, включающих в совокупности всю последовательность ДНК-источника (геномную ДНК или кДНК). Затем проводится **скрининг** библиотеки с помощью одной из описанных ниже процедур.

- **Сиквенс-специфический скрининг.** Его осуществляют либо путем гибридизации с использованием меченого ДНК- или РНК-зонда (дополнение 1-3), либо с помощью ПЦР. В любом случае этот метод выявления нужного клона в библиотеке основан на способности зонда или пары праймеров узнавать определенную комплементарную последовательность. Подходящие зонды или праймеры могут быть выбраны на основа-

Таблица 1-1

Геномная ДНК

Всего ДНК

Гены

Представлены

Гены представ

ционально)

нии

нов

ных

посл

•

экс

спо

бел

мо

•

пре

ни

но

•

дл

пр

си

на

д

(

л

(

д

н

Таблица 1-1 Свойства геномной ДНК и кДНК

Геномная ДНК	кДНК
Во всех тканях одного организма геномная ДНК (за редким исключением) одна и та же	Состав смеси кДНК зависит от ткани, стадии развития и состояния клеток
Гены находятся в собственном для них от природы окружении (включая спейсерные участки ДНК, регуляторные элементы, интроны)	Представлены только транскрибируемые по следовательности. Отсутствуют спейсерные участки ДНК, регуляторные элементы или интроны. Варианты альтернативного сплайсинга представлены разными кДНК
Представлены все гены	Представлены только экспрессирующиеся в тканях гены, с которых были получены мРНК
Гены представлены в равной степени (пропорционально)	Различные гены представлены в разной степени: сильно экспрессирующиеся гены дают больше транскриптов и, соответственно, больше копий кДНК, чем слабо экспрессирующиеся гены

нии данных о структуре частичных клонов данного гена, родственных генов из других организмов, консенсусных последовательностей, характерных для определенного семейства генов, или аминокислотных последовательностей белков.

- **Иммунологический скрининг.** Этот подход предполагает получение **экспрессионной библиотеки**, т. е. библиотеки кДНК, в которой все клоны способны продуцировать белки. Если доступно антитело, которое узнает белковый продукт интересующего гена, то соответствующий ДНК-клон может быть выделен.

- **Функциональный скрининг.** В этом случае также необходима экспрессионная библиотека. Процедура скрининга предполагает тестирование функции белка, т. е. наличия определенной ферментативной активности или определенного эффекта в культивируемых клетках.

В отличие от клеточного клонирования, ПЦР можно использовать для выделения фрагментов ДНК непосредственно из источника (без предварительного создания библиотеки), по существу следуя стратегии сиквенс-зависимого скрининга. Как упоминалось выше, стандартная процедура ПЦР позволяет амплифицировать фрагменты длиной до 5 тыс. п. н. Однако недавний более усовершенствованный вариант (**ПЦР длинных фрагментов**), при котором используется смесь ДНК-полимераз, позволяет амплифицировать более протяженные фрагменты (до 50 тыс. п. н.). **Обратно-транскриптазная ПЦР (ОТ-ПЦР)** — стандартная процедура для амплификации кДНК исходя непосредственно из мРНК. В этом случае в одной и той же пробирке сначала происходит реакция обратной транскрипции мРНК, а затем — амплификация полученной кДНК.

Описанные выше методы можно использовать только в том случае, если есть возможность сконструировать зонды или праймеры или име-

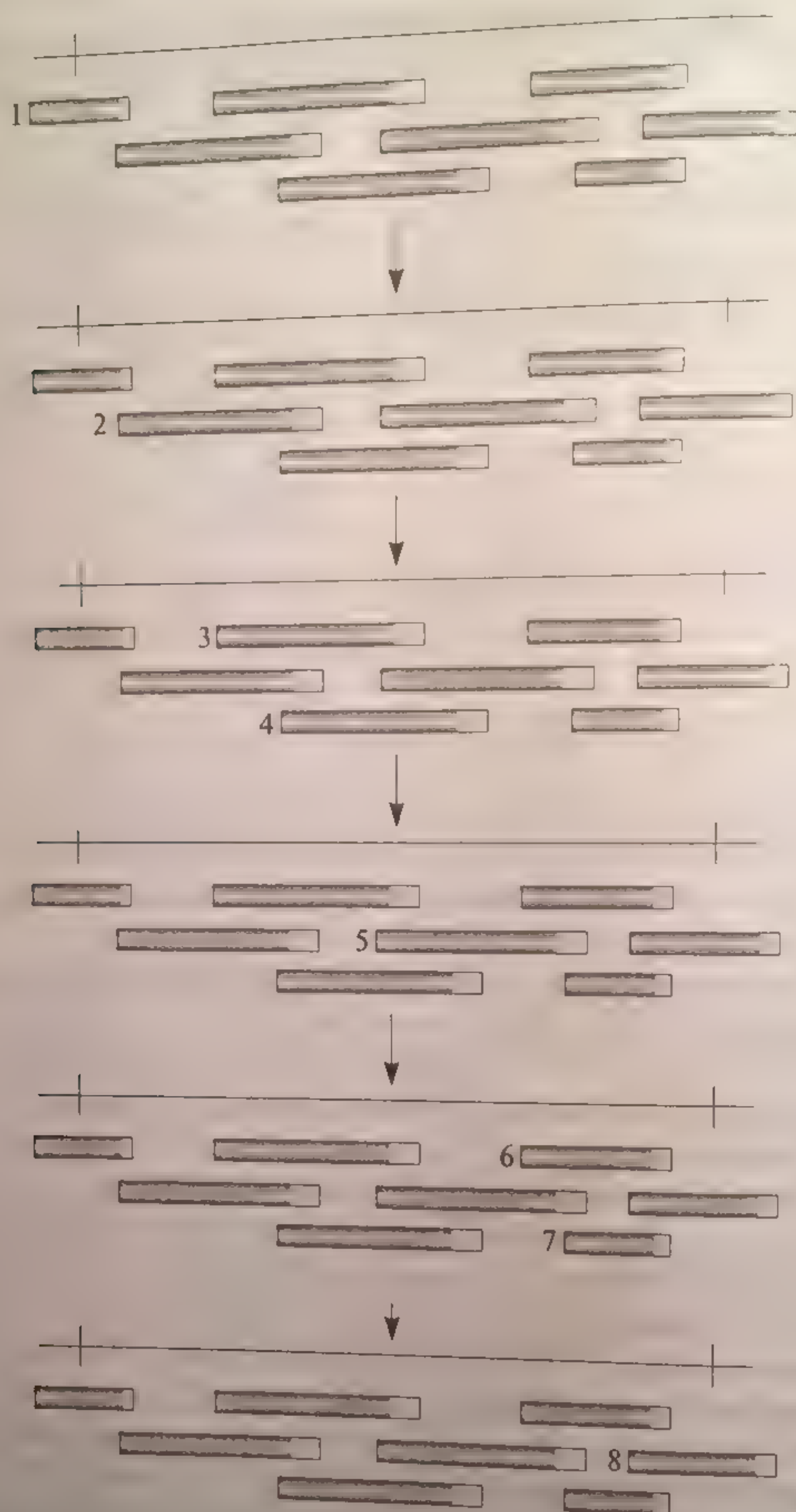


Рис. 1-3 «Прогулка по хромосоме». Верхняя линия изображает кандидатный участок генома размером 1 млн п. н., ограниченный с двух сторон двумя генетическими маркерами (показаны вертикалями). Ниже расположены вставки из различных перекрывающихся генетических маркеров, формирующие карту контигов. При создании такой карты один из генетических маркеров (например, полиморфизма длины рестрикционных фрагментов теки, начинающийся клоном 1. Если использовать в качестве зонда для скрининга ВАС-библиотеки ДНК клон 1, то можно идентифицировать клон 2. Аналогично с помощью клон 2 идентифицируют клоны 3 и 4, а на основе одного из последних можно найти клон 5. Наконец, клон 5 гибридизуется с клонами 6 и 7, каждый из которых позволяет идентифицировать клон 8. Клон 8 гибридизуется со вторым генетическим маркером, таким образом получается набор клонов, полностью покрывающих кандидатный участок.

ется какая-либо информация о функции интересующего гена. Однако для генов, участвующих в развитии большинства болезней человека, эти методы непригодны, поскольку единственная имеющаяся информация — это данные о симптомах болезни. В таком случае широко используется подход, называемый **позиционным клонированием**, когда сначала проводят локализацию гена, ответственного за развитие болезни, в определенном участке генома. Расположенные вблизи картированного гена известные последовательности ДНК (как правило, генетические маркеры на начальных стадиях картирования или иногда другие ориентиры в хромосоме, например хромосомные разрывы) используют для того, чтобы начать анализ методом «прогулки по хромосоме», при котором получают набор клонов, содержащих перекрывающиеся фрагменты, полностью охватывающие интересующий участок генома (рис. 1-3). На этом участке затем ведется поиск генов с целью найти тот, который содержит мутацию у людей, страдающих от болезни, но не мутирован у здоровых индивидуумов.

Функциональная характеристика клонированных генов

Клонирование гена, например гена человека, ответственного за какую-либо болезнь, — это только первый шаг на длительном пути. Как только клон получен, очень важно как можно больше узнать об этом гене, так как это обеспечит понимание его функции в нормальной клетке и роли в патогенезе заболевания. Исчерпывающее представление о функции гена в норме и при болезни необходимо для разработки новых терапевтических методов. Существует множество подходов к исследованию функции гена (рис. 1-4).

- Анализ экспрессии гена. Экспрессия гена может ограничиваться только определенными клетками, тканями, определенными стадиями развития или может быть индуцирована внешними сигналами (например, гормонами). Изменения паттернов генной экспрессии могут играть важную роль в патогенезе, а мутации в одном гене могут оказывать влияние на характер экспрессии других генов. Экспрессию генов можно изучать с помощью таких методов, как нозерн-блот-гибридизация и гибридизация *in situ* (дополнение 1-3).

- Анализ локализации белка. Если в результате экспрессии гена образуется рекомбинантный белок, то для выяснения локализации этого белка можно использовать антитела. Вестерн-блоттинг аналогичен нозерн-блоттингу и включает электрофоретическое разделение смеси белков с последующей детекцией специфических белков с помощью антител. Точную локализацию белков в тканях и даже внутри клеток можно установить с помощью иммунохимического анализа *in situ*.

- Анализ белковых взаимодействий. Для изучения взаимодействий интересующего белка с другими белками, нуклеиновыми кислотами и малыми молекулами можно использовать различные генетические и биохимические методы. Такого рода исследования дают возможность выявить

Дополнение 1-3 Значимость метода гибридизации на примере саузерн-блоттинга

Гибридизация, т. е. комплементарное спаривание оснований между одноцепочечными нуклеиновыми кислотами, — один из ключевых методов молекулярной биологии. Этот метод позволяет идентифицировать специфические последовательности ДНК в сложных смесях. Для этого одну молекулу нуклеиновой кислоты каким-либо путем **метят** для облегчения детекции, а затем используют в качестве **зонда** для поиска специфической (комплементарной) последовательности-мишени. Например, при **блот-гибридизации**

по Саузерну (саузерн-блоттинг) геномную ДНК расщепляют на фрагменты, разделяют электрофорезом в агарозном геле, переносят на мембрану и фиксируют, создавая отпечаток геля. Затем ДНК денатурируют (для разделения цепей) и добавляют зонд. Зонд гибридизуется со специфической последовательностью-мишенью, и его положение на мембране может быть выявлено в виде полосы после определения метки (рис. Д1-3.). Аналогичную процедуру можно использовать для идентификации специфических молекул РНК в

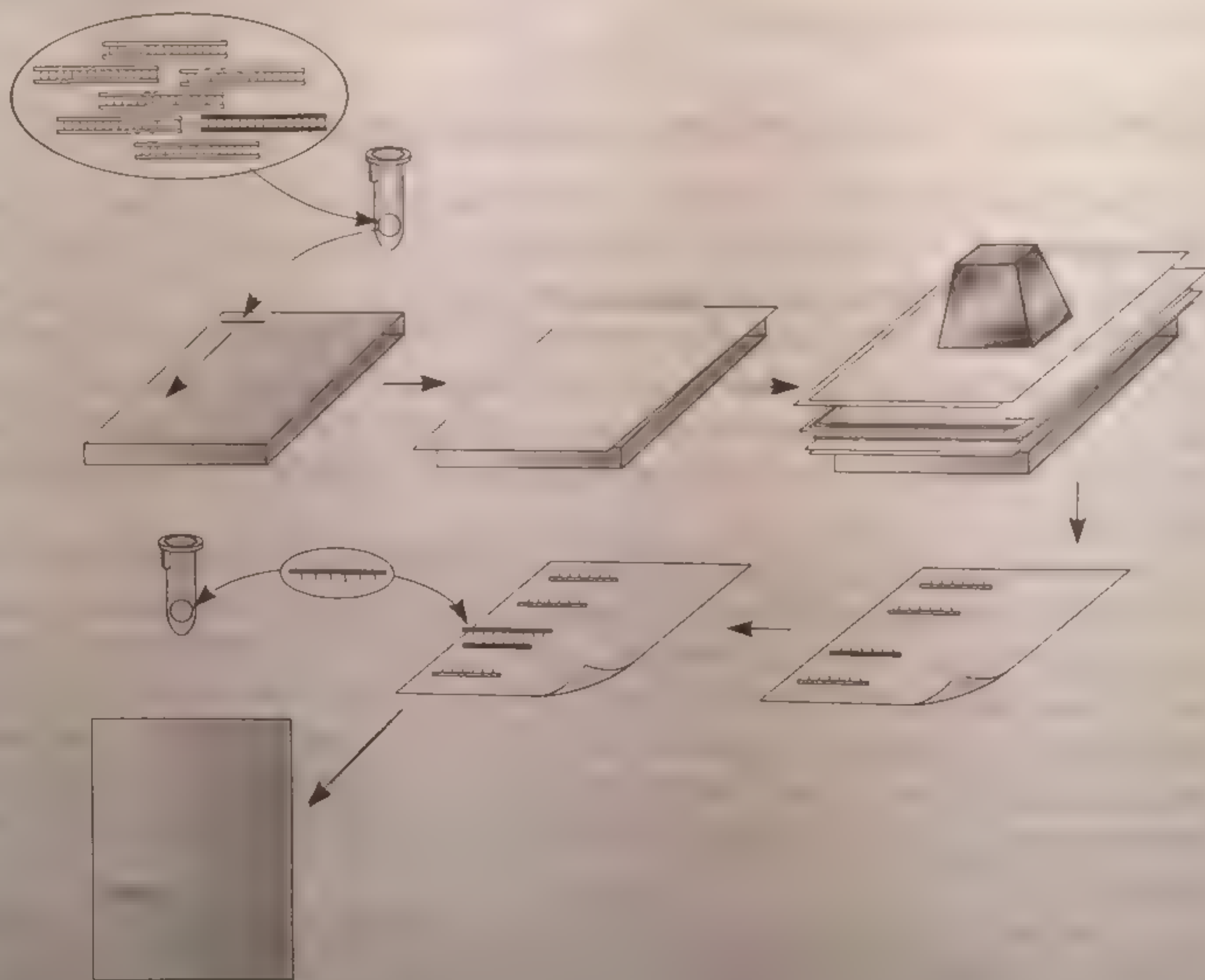


Рис. Д1-3 Значимость метода гибридизации в молекулярной биологии на примере саузерн-блоттинга. Сложную смесь молекул ДНК (кДНК, расщепленная геномная ДНК), содержащую интересующую последовательность (отмечены жирно), подвергают электрофоретическому разделению и переносят на мембрану капиллярным блоттингом. Для этого на поверхность геля помещают мембрану, затем сверху плотно прижимают несколько слоев фильтровальной бумаги, так что буфер, проходя через мембрану, одновременно переносит на нее ДНК. Обычно используют щелочной буфер, так что ДНК денатурирует на отдельные цепи. Имобилизованную ДНК гибридизуют с меченым зондом, узнающим целевую последовательность. В результате детекции на мембране обнаруживают единственную полосу.

смесях после электрофоретического разделения последних (**нозерн-блот-гибридизация**) или в образцах тканей, зародышах или эксплантатах *in situ* (**гибридизация *in situ***). Гибридизация используется также для идентификации клонов при скрининге библиотек (**гибридизация на колониях или фаговых бляшках**).

Традиционно в ДНК- и РНК-зонды вводят радиоактивную метку, которую детектируют **радиоавтографией** (накладывание чувствительной к радиоактивному излучению пленки) или с помощью «**фосфоимиджера**» (исполь-

зование чувствительного к радиоактивному излучению экрана). Однако радиоактивные метки постепенно вытесняются нерадиоактивными, такими как флуорофоры, ферменты, которые можно детектировать колориметрическими методами, флуоресцентные субстраты или гаптены (которые можно определять с помощью антител). Какая бы метка ни использовалась, процедура ее введения подразумевает синтез ДНК или РНК с участием нуклеотидных аналогов или реакцию концевое мечения под действием ДНК-модифицирующих ферментов (дополнение 1-1).

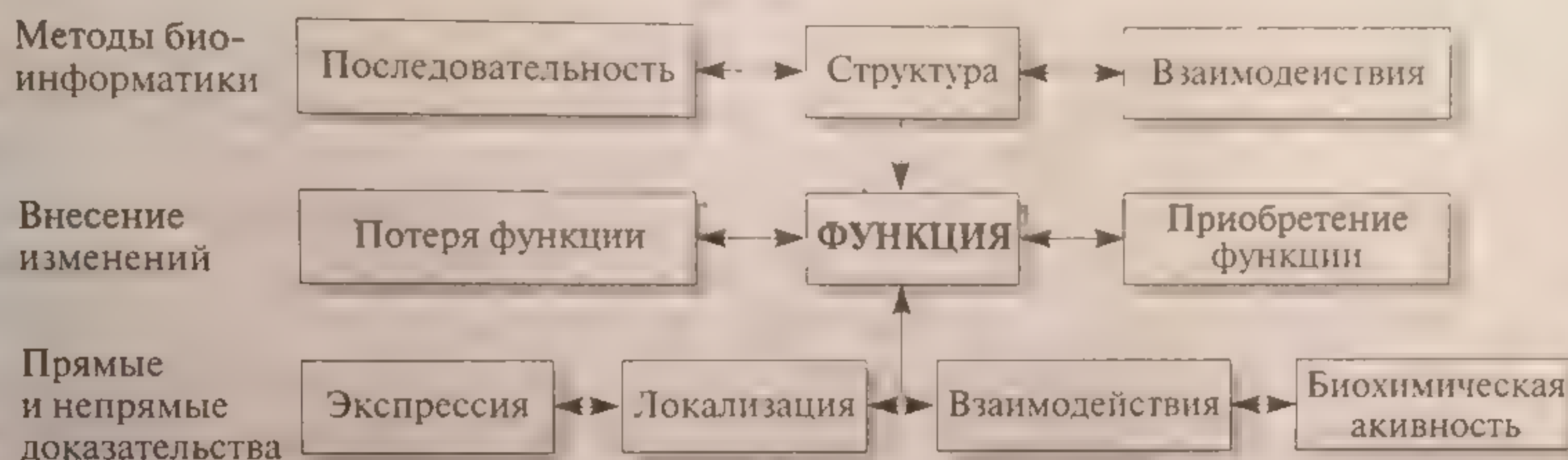


Рис. 1-4 Выбор подходов к всестороннему исследованию функции гена. С помощью компьютерных программ можно анализировать последовательности и высшие структуры белков и предсказывать взаимодействия последних на основании структурных данных. Кроме того, можно высказывать предположения относительно возможных функций, опираясь на информацию, имеющуюся для родственных структур. Функции можно устанавливать непосредственно путем введения мутаций или интерференции, что вызывает потерю функции, или по данным суперэкспрессии/эктопической экспрессии, что приводит к возникновению функции. Дополнительные данные могут быть получены из экспериментов по экспрессии мРНК/белка, локализации белка, а также в результате прямого экспериментального изучения белковых взаимодействий и биохимической активности. Эти подходы более детально описаны в гл. 2.

функцию гена на молекулярном и клеточном уровнях, а также помогают увязать белки в комплексы или метаболические пути.

- **Изменение экспрессии гена или активности продукта.** Если ген клонирован, то дальнейшие шаги могут включать направленный мутагенез гена или устранение его функции путем подавления экспрессии или активности продукта. Известны различные методы, которые могут быть использованы для изучения **потери функции гена**, а именно: случайный мутагенез, направленный мутагенез, подавление генной экспрессии с использованием антисмысловой РНК, рибозимов или РНК-интерференции, подавление активности белка с помощью антител (см. гл. 8). Можно также изучать последствия **приобретения функции гена** с помощью суперэкспрессии, экспрессии, выходящей за пределы нормальных пространственных и временных рамок (эктопическая экспрессия) или экспрессии

мутантного варианта белка, который более активен, чем нормальный. Такие методы дают возможность выяснить функцию гена на уровне клетки и всего организма в целом, а также позволяют создавать модели человеческих заболеваний на клетках и животных.

- Анализ белковой структуры. Если известна структура кодируемого геном белка, то можно моделировать его взаимодействия с другими белками и малыми молекулами.

От рекомбинантной ДНК к молекулярной медицине

Первые успехи в медицине, достигнутые благодаря появлению методов рекомбинантных ДНК, были связаны с выделением и характеристикой индивидуальных генов, важных с медицинской точки зрения, т. е. генов, ответственных за возникновение человеческих болезней, родственных им генов животных и генов патогенных организмов. Это привело не только к существенному возрастанию наших фундаментальных знаний о молекулярных основах болезней человека, но и способствовало развитию новой области медицины — **молекулярной медицины**, где методы рекомбинантных ДНК широко используются для профилактики, диагностики и лечения болезней. Вокруг молекулярной медицины выросла вся современная биотехнологическая промышленность и несколько ее ключевых областей, обсуждаемых ниже.

Использование ДНК-последовательностей в качестве инструментов диагностики

Одно из первых приложений методов рекомбинантных ДНК в медицине — использование ДНК-последовательностей в качестве инструментов диагностики. Как и в случае выделения генов из библиотек клонов, зонды и ПЦР-праймеры могут быть использованы для детекции последовательностей ДНК, связанных с заболеванием. Очень важно то, что нет необходимости дожидаться проявления симптомов болезни. Например, наследственные заболевания можно определять на стадии внутриутробного развития — путем отбора ворсинок хориона — или до появления симптомов (в случае болезней с поздним проявлением, как, например, болезнь Хантингтона). Аналогично, методы гибридизации или ПЦР-анализ могут быть использованы для обнаружения патогенов или злокачественных клеток еще до появления характерных признаков инфекционных или раковых заболеваний. Рассматриваемый подход особенно полезен для поиска в компонентах крови латентных (скрытых) патогенов, таких как ВИЧ, а также для быстрой идентификации патогенных организмов при острых инфекциях, что позволяет как можно скорее назначить правильное лечение необходимыми препаратами.

Один из первых примеров ДНК-диагностики — определение методом гибридизации болезней, связанных с дефектами гемоглобина, известных как гемоглобинопатии. Как уже упоминалось выше, глобиновые гены были в числе первых клонированных генов человека благодаря обилию их кДНК в ретикулоцитах. Меченые кДНК глобинов здоровых индивидуумов подвергали гибридизации по Саузерну с геномной ДНК, полученной от здоровых людей и от больных, страдающих различного рода гемоглобинопатиями. Это позволило выявить изменения в расположении полос ДНК, специфического для той или иной болезни.

Некоторые мутации, вызывающие заболевание, приводят к появлению или исчезновению сайта рестрикции, благодаря чему с помощью саузерн-блот-гибридизации можно сразу диагностировать болезнь. Это имеет место в случае серповидноклеточной анемии, которая вызывается точковой мутацией в β -глобиновом гене. Мутация нарушает сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *MstII*, что позволяет идентифицировать больных серповидноклеточной анемией (и носителей дефекта) по наличию необычно длинных рестрикционных фрагментов при разрезании ДНК ферментом *MstII* (рис. 1-5). В других случаях отсутствуют один или более рестрикционных фрагментов, причем сходные результаты наблюдаются для различных эндонуклеаз рестрикции. Это предполагает наличие крупной делеции (например, при талассемии) (рис. 1-5б).

Лишь немногие болезни можно диагностировать на основе точковых мутаций, которые меняют сайты рестрикции, поэтому рестрикционный анализ не является обязательным для детекции мутаций. Если удастся идентифицировать точковую мутацию, вызывающую болезнь, то могут быть получены синтетические олигонуклеотиды, соответствующие по структуре нормальной и мутантной последовательности. Эти **аллель-специфические олигонуклеотиды (АСО)** можно использовать двумя способами. С помощью более длинных АСО можно проводить **аллель-специфическую гибридизацию**, при которой АСО метят и гибридизуют, причем условия подбираются таким образом, чтобы образовывались только совершенные комплексы (не содержащие неспаренных оснований) между такими олигонуклеотидами и соответствующей геномной ДНК. Другой способ предполагает использование более коротких АСО в качестве праймеров для **аллель-специфической ПЦР**. В этом случае последний нуклеотид праймера выбирается в качестве дискриминирующего, поскольку не происходит удлинения праймера, если 3'-концевой нуклеотид оказывается неспаренным (рис. 1-6).

Получение терапевтических белков

Встраивание в клонирующий вектор регуляторных элементов, необходимых для контроля генной экспрессии, позволяет экспрессировать клонированный ген и получать **рекомбинантный белок**. Существует множество приложений этой технологии, в частности (как упоминалось выше) использование экспрессионных библиотек для выделения генов.

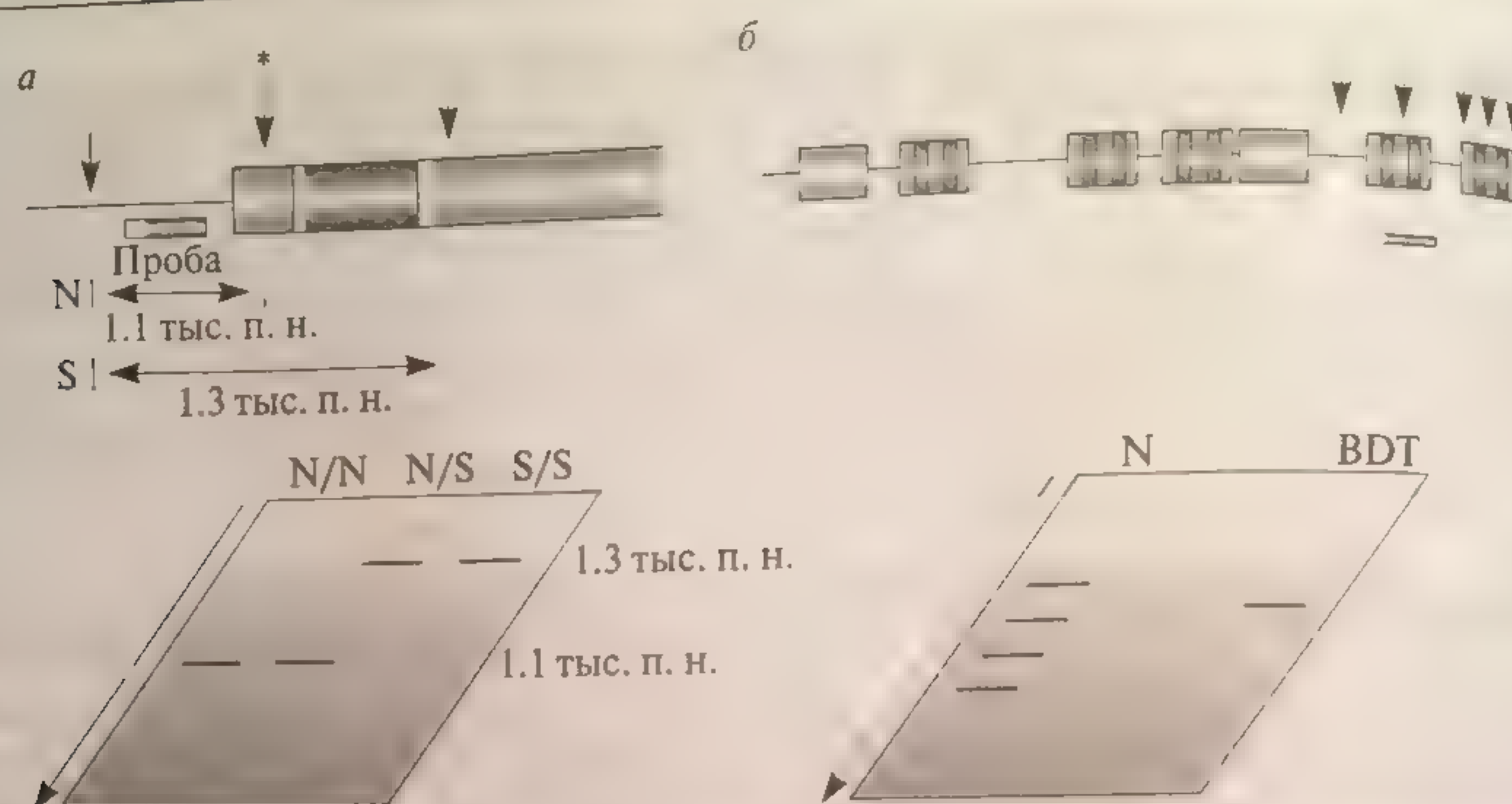


Рис. 1-5 Использование последовательностей ДНК для диагностики. *а* — диагностика заболевания путем анализа точковых мутаций, меняющих число сайтов рестрикции, на примере серповидноклеточной анемии. *Вверху* — ген β -глобина человека (более светлый участок — кодирующий район, а более темный — первый интрон). Вертикальными стрелками показаны сайты рестрикции для фермента *MstII*. У нормальных индивидуумов имеется три сайта, и зонд выявляет фрагмент геномной ДНК размером 1,1 тыс. п. н. Мутация (*), ответственная за возникновение болезни, разрушает центральный сайт рестрикции, так что зонд детектирует другой фрагмент длиной 1,3 тыс. п. н. *Внизу* — результаты саузерн-блоттинга для ДНК, полученной из нормальных (N/N), гетерозиготных (N/S) и больных серповидноклеточной анемией (S/S) индивидуумов. Стрелкой указано направление движения ДНК при электрофорезе. Отметим сходство этого метода с методом определения ПДРФ (см. с. 44); *б* — диагностика болезни путем выявления делеций, приводящих к исчезновению рестрикционных фрагментов. *Вверху* — β -глобиновый кластер с идентифицированными генами и псевдогенами. Вертикальными стрелками показаны сайты рестрикции *EcoRI* в генах β -глобина и δ -глобина. *Внизу* — результаты блот-гибридизации по Саузерну. В случае ДНК нормальных индивидуумов (N) зонд на основе кДНК β -глобина (отрезок на схеме) позволяет обнаружить несколько фрагментов, поскольку в не очень жестких условиях гибридизации возможна перекрестная гибридизация с δ -глобиновым геном. У индивидуумов с $\beta\delta$ -талассемией (BDT) указанные два гена делетированы, и гибридизация с любыми остаточными фрагментами ДНК, находящимися между внешними сайтами рестрикции, дает лишь одну полосу на геле. Тот же результат можно ожидать и с другими ферментами рестрикции, например *HindIII*. Отметим сходство этого метода с картированием потери гетерозиготности в случае рака (см. с. 153).

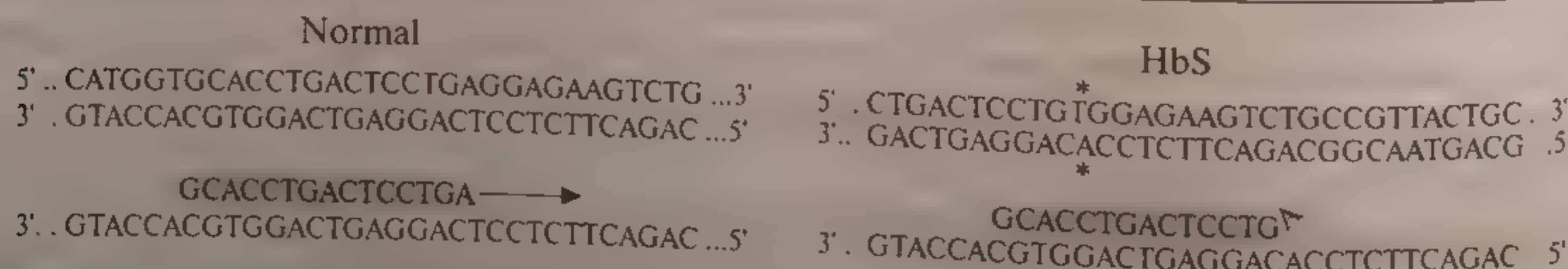


Рис. 1-6 Аллель-специфическая ПЦР для диагностики серповидноклеточной анемии. *Вверху* — нормальная и мутантная последовательности гена β -глобина (положение мутации отмечено *). *Внизу* — амплификация с помощью ПЦР-праймера, соответствующего по структуре нормальной последовательности. Он будет достраиваться в случае нормальной матрицы (слева), а в случае мутантной матрицы достройки (справа) не будет, так как 3'-концевой нуклеотид не комплементарен матрице и не будет с ней отжигаться.

Однако в медицине первостепенное значение применения экспрессионных технологий связано с производством рекомбинантных белков для терапевтических целей.

Человеческие белки как лекарственные препараты

Синтез терапевтических белков — одно из первых применений технологии рекомбинантных ДНК в коммерческих целях, причем первоначальными продуктами были простые белки, в частности человеческие гормон роста и инсулин, потребность в которых была чрезвычайно велика, а природный источник не удовлетворял нужным требованиям. Во многих случаях аутентичный продукт приходилось выделять из трупов или животных, что было сопряжено с риском заражения патогенами. Например, у некоторых детей, которых лечили гормоном роста, выделенным из гипофиза умерших людей, впоследствии развивалась болезнь Крейцфельда—Якоба, а у многих пациентов, которым вводили компоненты человеческой крови, впоследствии проявлялся гепатит или ВИЧ-инфекция.

Первые рекомбинантные белки были получены в бактериях в конце 1970-х годов, и до сих пор крупномасштабная ферментация бактерий широко используется в биотехнологическом производстве. Однако этот подход пригоден только для простых белков, поскольку в бактериях отсутствуют многие виды посттрансляционной модификации, включая гликозилирование. Поэтому для получения сложных гликопротеинов потребовались другие системы. Были достигнуты некоторые успехи с использованием дрожжей и клеток насекомых, однако гликановые (олигосахаридные) цепи, присоединяемые при этом к рекомбинантным белкам, радикально отличаются от тех, что производят клетки млекопитающих. Поэтому многие сложные рекомбинантные белки человека производят при крупномасштабном культивировании клеток млекопитающих. Поскольку это очень дорого, разрабатываются альтернативные системы, причем все большую популярность приобретает использование трансгенных животных и растений. Эта проблема более детально обсуждается в гл. 6.

Рекомбинантные вакцины

Предотвращение инфекционных болезней путем вакцинации имеет длинную и успешную историю, берущую начало с 1796 г., когда Эдвард Дженнер привил одному мальчику коровью оспу, обеспечив ему самым надежным способом защиту от последующего заражения смертоносным вирусом натуральной оспы. Многие вакцины, используемые в наши дни, основаны на тех же принципах и называются «дженнеровыми вакцинами». Они содержат живые, но ослабленные (аттенуированные) бактерии или вирусы, которые заставляют организм вырабатывать защитный иммунный ответ против конкретного патогена (например, вакци-

ны против кори, паротита, краснухи, туберкулеза), а также «убитые вакцины» (инактивированные), т. е., когда сам патоген убит и более не способен к инфекции, но по-прежнему может стимулировать ответ иммунной системы.

К сожалению, с использованием описанных выше методов невозможно создать вакцины против всех наиболее распространенных болезней, поэтому требуются другие подходы. Альтернативной стратегией является использование **рекомбинантных субъединичных вакцин**. При этом эспрессируется ген одного специфического поверхностного белка патогена, и этот белок затем используется в качестве вакцины. Современные вакцины против гепатита В и гриппа представляют собой белковые субъединицы, продуцируемые в дрожжах. Поскольку эти инертные субъединицы не размножаются в вакцинированном организме, то не способны вызывать эффективный клеточный иммунный ответ. Чтобы добиться желаемой эффективности, гетерологичные антигены экспрессируют в аттенуированных бактериях и вирусах и используют как суррогатные живые вакцины. Например, вирус коровьей оспы был использован для экспрессии широкого набора белков различных патогенов, включая гликопротеин вируса бешенства, что позволило искоренить бешенство в некоторых регионах Европы. Недавно генетически измененные растения начали использовать для получения оральных вакцин, которые можно назначать путем непосредственного употребления в пищу растительного материала или после его минимальной обработки. Вакцины будут обсуждаться далее в гл. 3.

Особый статус рекомбинантных антител

Антитела связываются с антигенами-мишенями с высокой специфичностью и поэтому используются в молекулярной биологии для детекции, количественного определения и очистки белков. В медицине антитела применяются для профилактики, диагностики и лечения болезней. Например, антитела против поверхностного адгезина (белка патогена *Streptococcus mutans*, обитающего в ротовой полости) используются как лекарство для предотвращения разрушения зубов, а антитела, которые узнают специфические опухолевые антигены, могут использоваться для диагностики и лечения рака. Традиционный путь получения моноклональных антител (специфичных только к одной мишени) — слияние В-лимфоцитов из иммунизированных мышей с иммортализованными клетками миеломы, что приводит к получению **гибридомных клеточных линий**, способных продуцировать те самые специфические антитела в неограниченном количестве. Недостаток мышиных антител — их способность вызывать иммунную реакцию у человека. Для решения этой проблемы используют технологию рекомбинантных ДНК, включающую продукцию гуманизированных антител, различных производных рекомбинантных антител и слитых с другими белками антител (химерных антител). Более того, разнообразие искус-

ственных антител можно увеличить путем создания библиотек вариабельных областей, как в случае фагового дисплея. Рекомбинантные антитела обсуждаются в гл. 6.

Генная медицина

Так уж сложилось, что ДНК-последовательности использовались в диагностике болезней, а белки и другие «низкомолекулярные» препараты — для лечения или предотвращения заболевания. Однако это разграничение постепенно исчезает по мере развития новых методов терапии, известных под общим названием **генной медицины** (см. гл. 8). Один из методов генной медицины — **генная терапия**, которая подразумевает введение фрагментов ДНК в клетки человека *in vitro* или *in vivo* с целью лечения и надежного вылечивания заболевания. В большинстве случаев генная терапия нацелена на болезни, вызываемые мутациями в человеческих генах (наследственные болезни, рак) и, в идеале, предназначена для изменения генома и обеспечения полного излечения. В отличие от обычных лекарств, приводящих лишь к облегчению симптомов болезни, «терапевтическая» ДНК «наделена» способностью бороться с причиной заболевания путем исправления или компенсации самих мутаций. Другие методы генной медицины имеют сходства с традиционным медикаментозным лечением; при этом для блокирования экспрессии определенных мутантных генов при лечении рака или инфекционных заболеваний используют синтетические олигонуклеотиды, рибозимы, а также недавно обнаруженное явление РНК-интерференции. Например, в настоящее время осуществляется несколько генно-терапевтических испытаний, разрабатывающих стратегию борьбы с ВИЧ-инфекцией.

Особое направление генной медицины — **ДНК-вакцинация**. ДНК-вакцины представляют собой составы, содержащие ген, соответствующий антигену патогенного организма. В результате экспрессии такого гена в человеческом организме образуется антиген, который индуцирует иммунный ответ, обеспечивая защиту от возможных последующих инфекций. Такой подход чрезвычайно перспективен, так как одна и та же стратегия может быть использована для получения вакцины против многих болезней; кроме того, таким путем можно ожидать быстрого создания вакцин против вновь обнаруживаемых патогенов. Еще одно преимущество заключается в том, что ДНК легче хранить и транспортировать, чем белки.

Модели болезней

Еще одно важное применение технологии рекомбинантных ДНК — введение заранее запланированных мутаций в гены путем мутагенеза *in vitro* с последующим переносом таких измененных генов обратно в исходный ор-

ганизм для функционального тестирования. Из этических соображений такие эксперименты невозможно проводить с генами человека, однако можно моделировать **болезнь** путем имитации эффектов патогенных мутаций человека у животных. Модельные эксперименты можно использовать при изучении молекулярных основ болезни и (что очень важно) в целях тестирования новых лекарств до начала клинических испытаний на человеке.

Млекопитающие использовались в качестве живых объектов для моделирования болезней человека на протяжении многих лет, но до недавнего времени этот подход базировался на выявлении спонтанных мутантов или скрининге популяций, подвергшихся мутагенному воздействию, для идентификации особей с фенотипом, похожим на интересующее заболевание (патологическим фенотипом). Технология рекомбинатных ДНК в сочетании с развивающейся технологией переноса генов млекопитающих позволила создавать **точные копии** человеческих патогенных мутаций путем интеграции доминантных плохо функционирующих трансгенов или замены эндогенного гена нефункциональной копией; этот метод обычно называется методом «генного нокаута». Совсем недавно появилась возможность моделировать на мышах более сложные заболевания путем одновременного введения мутаций в два или более генов.

Влияние геномики на медицину

Революционная технология рекомбинантных ДНК обеспечила нас инструментарием и методами, позволяющими выделять и охарактеризовывать индивидуальные гены, однако этот подход имеет два существенных ограничения. Во-первых, поиск генов — чрезвычайно трудоемкая и дорогостоящая работа. Во-вторых, это поддерживает **редукционистский** подход в биомедицинских исследованиях, хотя хорошо известно, что гены не функционируют в одиночестве. Тысячи генов должны работать вместе, чтобы координировать активность всех биологических процессов, протекающих в человеческом или любом другом организме. Вторая современная революция в медицине, **геномная революция**, призвана преодолеть эти недостатки, поддерживая развитие нового **холистического** подхода, при котором одновременно анализируется большое число генов и их продуктов. Геномика предполагает изучение всего генома, включая картирование, секвенирование, аннотирование (обнаружение генов) и функциональный анализ. Инструментарий и методы, предоставленные геномной революцией, — высокопроизводительные аналоги методов из эры рекомбинантных ДНК, но они позволяют получать и анализировать гораздо больше данных за более короткий промежуток времени.

В результате геномной революции начала 1990-х годов стал набирать силу проект «Геном человека». Первоначальные задачи проекта заключались в картировании и секвенировании всего человеческого генома с прицелом на идентификацию всех человеческих генов. Первый этап проекта включал создание генетической карты высокого разрешения, которая

могла служить опорной схемой для сборки карты ДНК-клонов. Затем эти клоны систематически секвенировали и полученные последовательности анализировали с целью обнаружения в них генов. Для осуществления поставленных задач необходимы были новые технические решения во всех областях, но наиболее впечатляющие успехи были достигнуты в области автоматизации секвенирования ДНК, что позволило 1000-кратно увеличить скорость получения данных по сравнению с уровнем 1980-х годов. Стимулом для технологических нововведений служила конкуренция со стороны частных компаний. В период выполнения проекта «Геном человека» параллельно были секвенированы геномы многих бактерий и некоторых эукариот, среди которых оказались геномы многих патогенных микроорганизмов и ряда важных модельных организмов, удобных для проведения экспериментов, таких как плодовая мушка (*Drosophila melanogaster*), червь нематода (*Caenorhabditis elegans*) и пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*). Мы не будем здесь рассматривать методологию геномного картирования и секвенирования, так как это подробно будет рассмотрено в гл. 2.

Продуктом первого этапа реализации проекта «Геном человека» стала первая черновая версия последовательности генома с аннотированием (описанием) большого числа генов (**транскрипционная карта**). Транскрипционная карта — наиболее важный для медицины результат проекта «Геном человека», поскольку при дальнейшем усовершенствовании методов работы это может обеспечить доступ ко всем генам человека. Таким образом, если первым достижением технологии рекомбинантных ДНК считается доступность отдельных генов человека, то первым достижением геномики стала доступность **всех генов**. Транскрипционная карта позволяет увеличить скорость выявления генов, связанных с болезнью, поскольку теперь нет необходимости разрабатывать изощренные стратегии их клонирования. Позиционное клонирование выходит из употребления, поскольку теперь, как только ген болезни картирован в определенном районе генома, сразу можно внимательно обследовать транскрипционную карту с целью обнаружения в этом районе генов-кандидатов для выявления их связи с болезнью.

Помимо крупномасштабных методов выделения генов геномная революция обеспечила также крупномасштабные методы функционального анализа. Действительно, невозможно говорить о геномике, не используя такие определения как «широкомасштабный», «высокопроизводительный» и «массовый параллелизм», при описании методов эксперимента. Значимость геномной технологии — в предельном увеличении производства данных при минимальных затратах ручного труда благодаря широкой автоматизации, миниатюризации и множественной параллелизации. Ниже эти методы описаны очень коротко, поскольку более детально обсуждаются в следующей главе. Однако все-таки советуем сравнить список, данный ниже, с приведенным на с. 23, 25–26.

- Анализ экспрессии генов. Высокопроизводительный анализ экспрессии путем широкомасштабного секвенирования кДНК, выборочного секвенирования и использования ДНК-микрочипов позволяет исследовать экспрессию тысяч генов одновременно. Это дает возможность

показать глобальное влияние различных условий на профили генной экспрессии, помогает объединить гены в экспрессионные классы по сходству экспрессии (**синэкспрессия**) и выявить дифференциально экспрессирующиеся гены.

- **Анализ белковой экспрессии.** Методы разделения белков высокого разрешения, такие как двумерный гель-электрофорез, могут быть использованы для фракционирования сложных белковых смесей, а масс-спектрометрия — для быстрой и точной идентификации индивидуальных белков. Можно проанализировать и сравнить экспрессию тысяч белков из различных образцов.

- **Анализ белковых взаимодействий.** Новые высокопроизводительные технологии, такие как фаговый дисплей, дрожжевая двугибридная система и масс-спектрометрический анализ белковых комплексов, позволяют в широком масштабе провести систематизацию взаимодействующих белков. Можно составить карты белковых взаимодействий для целых клеток.

- **Изменение характера экспрессии или активности генов.** Широкомасштабный мутагенез может быть использован для генерации популяций со случайными или направленными мутациями в каждом отдельном гене. Аналогично, РНК-интерференция может быть использована в крупномасштабном объеме для систематической инактивации всех генов в геноме. Если методы мутагенеза могут быть приложены только к модельным организмам, то РНК-интерференция может использоваться и в человеческих клетках.

- **Анализ белковой структуры.** С целью определения структуры многих белков инициированы широкомасштабные программы по «структурной геномике». Есть надежда, что будут определены структуры представителей всех белковых семейств для того, чтобы увеличить скорость, с которой будут устанавливаться функции генов.

Успехи в области **биоинформатики** (использование компьютерных технологий для обработки биологических данных) идут в ногу с достижениями в области геномики, поскольку только компьютеры способны анализировать огромные базы данных, предоставляемые крупномасштабными экспериментами по геномике. Один из наиболее существенных вкладов биоинформатика внесла в **анализ последовательностей**, что позволило провести сравнение последовательностей генов или целых геномов. Существует значительная структурная и функциональная консервативность между генами и даже целыми метаболическими путями человеческого и модельных организмов, таких как плодовая мушка, нематода и пекарские дрожжи. До 20% генов болезней человека имеют аналоги в дрожжах и до 60% — в нематоде и дрозофиле, что позволяет использовать эти организмы для функционального анализа и скрининга потенциальных лекарств. Аналогичным образом, сравнение бактериальных последовательностей, особенно безвредных бактерий и родственных им патогенов, помогает обнаруживать факторы вирулентности и белки, играющие роль в патогенезе, которые можно было бы использовать в качестве мишеней для новых лекарств или кандидатов для новых вакцин. Другая

важная роль
ном и удель
нению инд
для реаль
белевант
лечения. С
Геноме А
функцион

Новая мо

Потен
нов патог
левания,
лекарств
лекарств
того) бел
около 30
шениями
структур
тилетия
растущее
тенденци
зволит о
ных миш
ванием
процесс
Другое
влияние
мы обсу
струмен
довател
методы
миниа
за одно
вых му
постро
не вы
небол
другим
ная ре
«Гено
тизан
приче
чия в

важная роль биоинформатики — представление данных в легкодоступном и удобном для работы виде, что способствует быстрому распространению информации. Как мы увидим, некоторые базы данных уже сделали реальный вклад в наше понимание молекулярных механизмов заболевания, и это окажет огромное влияние на развитие новых методов лечения. Один из примеров — проект «Анатомия генома рака» (Cancer Genome Anatomy Project), цель которого собрать данные по экспрессии и функционированию генов при всех формах рака.

Новая молекулярная медицина

Потенциальная доступность всех генов болезней человека, а также генов патогенных микроорганизмов, ответственных за инфекционные заболевания, по-видимому, дает существенный импульс для разработки новых лекарственных препаратов. Большинство имеющихся в настоящее время лекарств взаимодействуют с относительно малым набором (500 или около того) белков-мишеней в организме человека. В геноме человека имеется около 30 тыс. генов, и многие из них потенциально являются новыми мишенями для лекарств. Поэтому функциональный анализ этих генов и структурный анализ их продуктов могли бы привести в ближайшие десятилетия к бурному росту числа разрабатываемых лекарств. Более того, растущее признание важности консервативных молекулярных путей и тенденция белков функционировать в составе больших комплексов позволит отбирать ключевые регуляторные молекулы в качестве лекарственных мишеней. Фармацевтические компании не будут медлить с использованием тех возможностей, которые предоставляет геномика; мы обсудим процесс создания лекарств в гл. 7.

Другой аспект геномики, который, вероятно, должен иметь большое влияние на медицину, — анализ **вариабельности ДНК** человека. Ранее мы обсуждали использование ДНК-последовательностей в качестве инструментов диагностики для идентификации особых вариаций в последовательностях ДНК, ассоциированных с болезнью. Совсем недавно методы, основанные на тех же принципах, были модернизированы и миниатюризированы для проведения высокопроизводительного анализа **однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП, SNP)**. В отличие от точковых мутаций, **вызывающих болезнь**, ОНП — это обычные широко распространенные в популяции варианты нуклеотидных замен. Хотя они не вызывают явных болезней, некоторые из них, как полагают, вносят небольшой, аддитивный вклад в предрасположенность к болезни или к другим сложным характеристикам организма, таким как индивидуальная реакция на лекарства. Возникшие в результате выполнения проекта «Геном человека» дополнительные программы направлены на систематизацию всех ОНП в геноме (предполагают, что их всего около 10 млн, причем между любыми двумя индивидуумами могут наблюдаться различия в 3 млн позиций), а также блоков ОНП, известных как **гаплотипы**,

которые тесно сцеплены и имеют тенденцию наследоваться как единая группа. Впервые появится возможность точно установить те генетические варианты, которые определяют нашу предрасположенность к таким распространенным болезням, как астма и диабет (см. гл. 4). Станет возможным идентифицировать генетические варианты, определяющие наш ответ на лекарства, что открывает путь к персонализированной медицине, учитывающей генетические особенности пациентов (см. гл. 7). Однако мы должны остерегаться злоупотребления генетической информацией, получаемой в рамках проекта «Геном человека» и связанных с ним программ. Значительная часть бюджета, выделенного на этот проект, была направлена на решение сопровождающих эти исследования социальных, правовых и этических проблем с целью сохранить в тайне имена тех, кто предоставил свою ДНК для исследований, а также препятствовать использованию данных генетического анализа для дискриминации отдельных личностей или этнических групп.

Об этой книге

Цель этой книги — дать широкую и всестороннюю оценку того, как технология рекомбинантных ДНК и геномики используется в медицине. В следующей главе изложены принципы геномики во всех деталях, достаточных для того, чтобы читатель понял материал, представленный в последующих главах. В гл. 3–5 обсуждается роль рекомбинантных ДНК и геномного анализа в диагностике, лечении и предотвращении инфекционных заболеваний, наследственных болезней и рака. Последующие три главы посвящены новым методам терапии и современной стратегии разработки лекарств. Композиция книги схематически приведена на рис. 1-7.

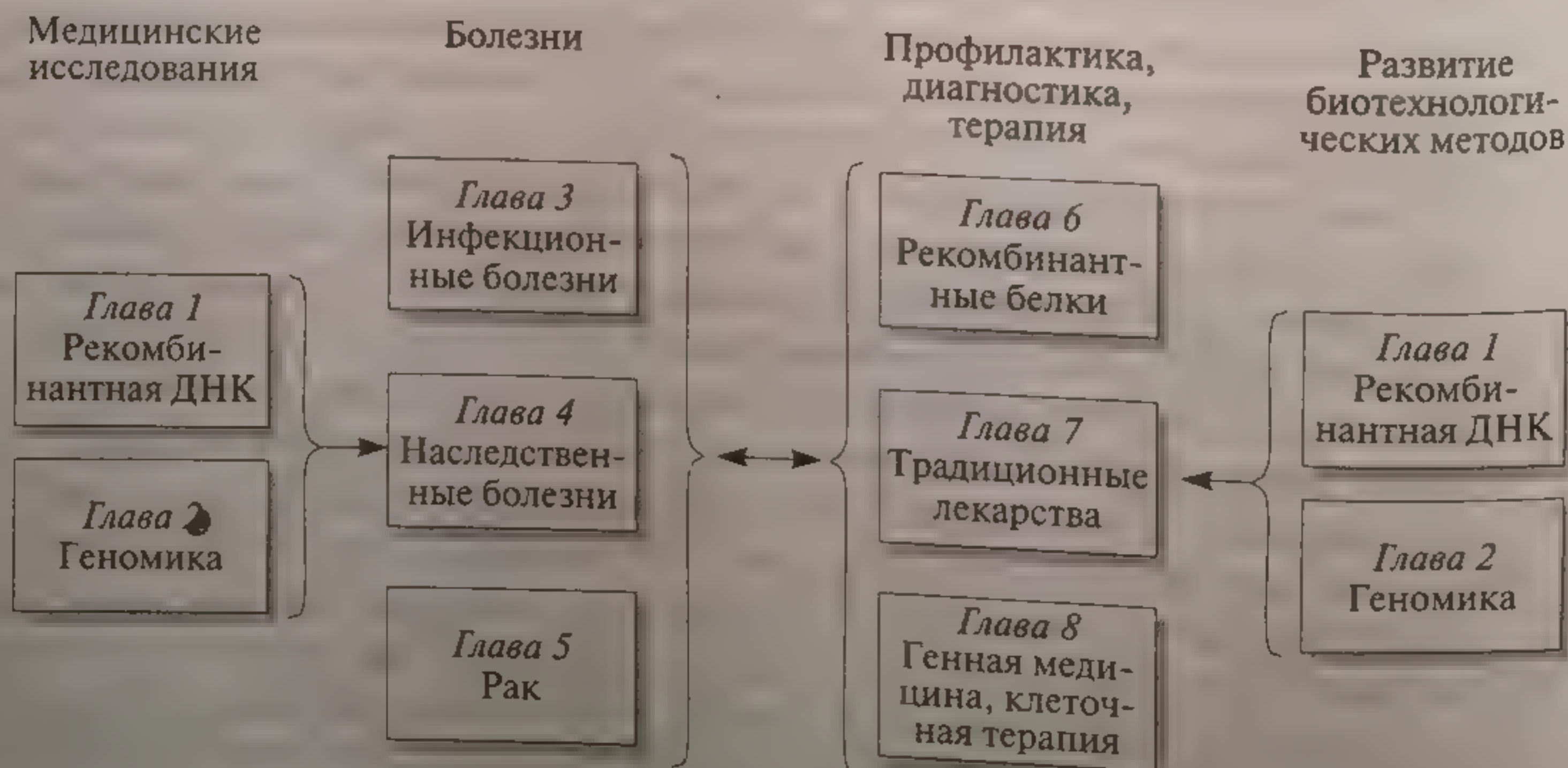


Рис. 1-7 Схема книги.

Дополнительная литература

POGM: Глава 1 знакомит с общими представлениями о технологии рекомбинантных ДНК и историей биотехнологической промышленности. В гл. 2 описаны основные методы, а в гл. 3–6 более детально обсуждаются векторы и стратегии клонирования. В гл. 14 есть разделы, посвященные использованию технологии рекомбинантных ДНК в медицине.

POGA: Глава 1 знакомит с геномикой и некоторыми аспектами ее применения. В гл. 12 есть разделы, посвященные применению геномики в медицине.

Две полезные статьи, посвященные роли геномики в молекулярной медицине (первая — краткий обзор, а вторая — более глубокий):

Williams SJ, Hayward NK (2001) The impact of the Human Genome Project on medical genetics. *Trends Mol Med* 7, 229–231.

Yaspo M-L (2001) Taking a functional genomics approach in molecular medicine. *Trends Mol Med* 7, 494–502.

Статья, демонстрирующая исчерпывающим образом роль микробной геномики в разработке новых способов борьбы с инфекционными заболеваниями:

Wren BW (2000) Microbial sequencing: insights into virulence, host adaptation and evolution. *Nature Rev Genet* 1, 30–38.

Основные принципы геномики

Введение

В предыдущей главе мы проследили историю молекулярной медицины с момента ее возникновения в результате открытия революционной технологии рекомбинантных ДНК и до наших дней, а также коротко обсудили некоторые аспекты возможного использования достижений геномики в науке и медицине. На данном этапе просматриваются огромные перспективы в этой области. Практически мы уже располагаем полной последовательностью человеческого генома и имеем потенциальный доступ к каждому из генов. Это дает поистине беспрецедентные возможности для глобальных и систематических исследований биологии человека, как в норме, так и при болезни. Такие же возможности к познанию открыты и в случае большого числа других организмов, представляющих интерес с медицинской точки зрения, включая наиболее важные патогенные микроорганизмы (табл. 2-1). В настоящее время основные медицинские исследования направлены на систематическую функциональную оценку генов и выяснение метаболических путей и генных сетей, в которых они участвуют. Полное понимание того, как гены функционируют и взаимодействуют, обеспечивая координацию основных биологических процессов, которые делают человека здоровым, может открыть широкий простор для развития новых методов терапии. В этой главе мы рассмотрим научные достижения, которые вывели нас на современный уровень, и обсудим некоторые развивающиеся геномные технологии, которые могут обеспечить в будущем новые прорывы в области медицины.

Новые достижения: проект «Геном человека»

Геномика (дополнение 2-1) стала важной и независимой областью исследования в 1990 г., когда официально был запущен проект «Геном человека» (HGP — human genome project). Заявленная цель проекта — определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) всего ядерного генома человека размером в 3000 млн п. н. (1 млн п. н. = 1 Мб (мегабаза); 1 тыс. п. н. = 1 кб (килобаза)) в течение 15 лет. Однако с самого начала было признано,

Таблица 2-1 Секвенированные геномы некоторых патогенных организмов (бактерий и простейших)

Патоген	Болезнь	Размер генома (Мб)
<i>Bacillus anthracis</i>	Сибирская язва	4,5
<i>Bordetella pertussis</i>	Коклюш	3,88
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Болезнь Лайма	0,95
<i>Helicobacter pylori</i>	Язва желудка	1,67
<i>Leishmania major</i>	Лейшманиоз	33,6
<i>Mycobacterium leprae</i>	Прокказа	2,8
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Туберкулез	4,4
<i>Plasmodium falciparum</i>	Малярия	23
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Тиф	1,1
<i>Salmonella typhi</i>	Тифоидная лихорадка	4,5
<i>Treponema pallidum</i>	Сифилис	1,1
<i>Trypanosoma brucei</i>	Сонная болезнь	54
<i>Vibrio cholerae</i>	Холера	2,5
<i>Yersinia pestis</i>	Чума	4,38

что требуется огромная подготовительная работа до того, как начнется фактическое секвенирование, и что в дополнение к человеческому (в качестве пилотных проектов для апробирования новых технологий) необходимо секвенировать геномы пяти модельных организмов (дополнение 2-2). Одна из

Термин **геном** был введен в 1920 г. немецким ботаником Гансом Винклером для описания коллекции генов, содержащихся в полном (гаплоидном) наборе хромосом. Сейчас значение этого термина расширилось и включает всю ДНК в гаплоидном наборе хромосом, а не только гены, поскольку у высших эукариот гены составляют лишь малую часть генома. Например, только 2–3% человеческого генома представлены генами. Хотя понятие «геном» существует издавна, термин **геномика** не использовался вплоть до 1986 г. Генетик Томас Родерик, специализирующийся в области изучения генома мыши, ввел это слово для обозначения картирования, секвенирования и характеристики геномов. Позже геномика

стала ассоциироваться с любой формой широкомасштабного, высокопроизводительного биологического анализа и дала начало целому ряду производных терминов. **Функциональная геномика** означает любой систематический подход к анализу функции гена; многие технологии функциональной геномики обсуждаются в этой главе. **Транскриптомика** — это широкомасштабный анализ экспрессии мРНК. **Протеомика** — это широкомасштабный анализ белков, который может быть подразделен на исследование экспрессионных профилей, взаимодействий и структуры белков. Протеомика очень важный компонент новой молекулярной медицины, поскольку большинство лекарственных мишеней — белки.

Дополнение 2-3 Генетический проект «Геном человека» первоначальные задачи

Escherichia coli (бактерия)
Saccharomyces cerevisiae (дрожжи)
Caenorhabditis elegans (нематода)

Drosophila melanogaster (плодовая мушка)
Mus musculus (мышь)

первых задач заключалась в создании генетической карты человеческого генома высокого разрешения как основы для сборки карты ДНК-клонов. Начинать секвенирование можно было после завершения фазы генетического и физического картирования. Чтобы достичь указанных в проекте HGP целей в заявленных временных рамках, необходимо было усовершенствовать технологии картирования, клонирования, секвенирования и биоинформатики. Значительная часть первоначального бюджета проекта была также направлена на решение дискуссионных **этических, юридических и социальных аспектов (ЭЮСА или от англ. ELSI)** при выполнении проекта, например, таких как предотвращение использования полученных в рамках проекта данных для дискриминации отдельных лиц или групп населения (дополнение 2-3).

(ELSI) проекта «Геном человека»

Еще до официального старта проекта «Геном человека» стало ясно, что и разрабатываемые пути реализации проекта, и получаемые в его рамках данные создадут новые, сложные этические проблемы. Особыми областями, вызывающими беспокойство в этом отношении, являются те, которые связаны со сбором образцов, обеспечением конфиденциальности в отношении доноров, доступностью и дальнейшим использованием накапливаемой в процессе выполнения проекта генетической информации. В США в качестве спонсоров выступили Департамент энергетики США (DE) и Национальный институт здоровья (NIH), которые в своих годовых бюджетах предусмотрели финансирование (3% и 5% соответственно) проекта «Геном человека» на исследование этических, юридических и социальных программ проекта. Задача программ ELSI была и есть — содействовать обучению и выработке продуманных решений путем консультаций с широким кругом заинтересованных сторон. Особенность программ

ELSI состоит в том, что они являются неотъемлемой частью самого проекта, а не решают ретроспективные задачи. Следовательно, они направлены на предвидение последствий разработки новых технологий и поиск решения до того, как возникли реальные проблемы.

Первоначальные цели программ ELSI:

- Доводить до сведения и разъяснять отдельным людям и всему обществу значение картирования и секвенирования генома человека.
- Изучать этические, правовые и социальные последствия картирования и секвенирования генома человека.
- Стимулировать публичное обсуждение проблем.
- Разрабатывать правовую базу, в том числе тактические приемы, гарантирующую использование получаемой научной информации во благо отдельного человека и общества в целом.

За 10 лет с момента принятия программ ELSI, была проделана большая работа по информированию высших должностных

лиц и общественности. Такая ситуация способствовала разработке стратегии, касающейся проведения генетических исследований и коммерческого использования генетической информации, а также связанных с этим технологий. Некоторые из наиболее важных и острых вопросов относились к сопутствующим проектам, которые направлены на изучение генетических вариаций человека, т. е. проект картирования ОНП и проект картирования гаплотипов. В этих случаях должна соблюдаться конфиденциальность в отношении индивидуумов и сообществ, предоставляющих образцы ДНК, но при этом необходимо также получить их информированное согласие и обеспечить с ними постоянное взаимодействие. Главная причина беспокойства заключается в том, что информация о генетических вариациях может быть использована для дискриминации индивидуумов или групп людей при трудоустройстве, страховании или применении законов. Программы ELSI имели предупредительную направленность с тем, чтобы полученные данные не повлияли на гуманистические взгляды, касающиеся рас и этнической принадлежности, а также возможность предвидеть влияние технологических успехов и доступности генетических данных на целостное понимание гуманно-

сти. Образовательные ресурсы не только позволяют своевременно информировать общественность и высших должностных лиц, но также помогают ученым более осторожно представлять результаты, чтобы избежать их ошибочного толкования.

Цели программ ELSI обновляются каждые несколько лет; ниже приведена самая последняя версия.

- Изучать проблемы, связанные с завершением секвенирования ДНК человека и исследованием генетических вариаций человека.

- Изучать проблемы, возникающие в связи с интеграцией генетических технологий и внедрения информатизации в систему здравоохранения.

- Изучать проблемы, возникающие в связи с интеграцией знаний о геномике и о взаимодействиях «ген — окружающая среда» в неклинической сфере.

- Исследовать, как новые генетические знания могут взаимодействовать со множеством философских, теологических и этических учений

- Исследовать, как расовые, этнические и социально-экономические факторы влияют на использование, понимание и интерпретацию генетической информации, на использование генетических служб и на развитие политики.

Чтобы в полной мере оценить амбициозность технических задач HGP, достаточно напомнить, что в середине 1980-х годов, когда проект только задумывался, можно было секвенировать около 1000 нуклеотидов в день. При такой скорости для завершения всей работы по расшифровке генома потребовалась целая армия ученых, которые бы не делали ничего, кроме секвенирования. Сидни Бреннер, один из сторонников крупномасштабных подходов в биологии, даже шутил, что секвенированием должны заниматься заключенные! Было очевидно, что необходимы совершенно новые методы секвенирования, чтобы поднять эффективность работы на требуемый уровень. Несмотря на то что в ходе выполнения HGP были разработаны новые методы, все же цель увеличения выхода получаемых данных была достигнута в основном благодаря автоматизации и значительному усложнению уже существующих технологий. С помощью сверхскоростных капиллярных секвенаторов, способных обрабатывать одновременно 96 проб, теперь на одной машине можно расшифровывать более полумиллиона нуклеотидов в день. Дальнейшее усложнение и использование большого количества машин может еще больше ускорить этот процесс.

Революция в генетическом картировании

Генетические карты получают на основе анализа частоты рекомбинации, а в случае модельных организмов их конструируют путем проведения большого количества скрещиваний между различными мутантными линиями. Принцип построения генетической карты основан на том, что чем дальше друг от друга находятся два локуса на хромосоме, тем больше вероятность, что между ними произойдет кроссинговер во время мейоза. Рекомбинантные события, возникающие в результате кроссинговера, могут быть посчитаны у генетически удобных организмов, таких как *Drosophila* и дрожжи, путем поиска новых комбинаций мутантных фенотипов у потомков, полученных в результате скрещивания. Однако этот подход не может быть использован для человеческой популяции, поскольку он предполагает проведение широкомасштабных экспериментов по скрещиванию между людьми с разными наследственными заболеваниями. Взамен этого генетические карты человека основываются на анализе **полиморфизмов последовательностей ДНК** у существующих семейных родословных (дополнение 2-4).

Дополнение 2-4 Вариации в геноме человека

Используемая в рамках проекта «Геном человека» (HGP) ДНК получена от 12 анонимных добровольцев. Поскольку последовательности геномов любых двух неродственных человеческих индивидуумов идентичны лишь на 99,9%, то «правильной» последовательности не существует. Однако именно эти различия (0,1% всего генома), составляющие около 3 млн п. н., и представляют наибольший интерес, поскольку делают каждого из нас уникальным. **Генетические мутации**, которые вызывают наследственные заболевания, очень редки у населения в целом и, следовательно, составляют лишь небольшую долю вариаций. Подавляющее большинство последних существует в форме **полиморфизмов последовательностей ДНК**, где несколько различных вариантов **аллелей** могут быть весьма распространенными. Эти вариации используются в качестве маркеров для создания генетических карт, поскольку аллели можно обнаруживать и идентифицировать гибридизацией или ПЦР-анализом (см. гл. 1) и, таким образом, устанавливать, происходила ли рекомбинация в семейной родословной.

Типы вариаций

Около 95% полиморфных последовательностей представлено **однонуклеотидными полиморфизмами (ОНП)**, т. е. позициями единичных нуклеотидов, которые у одних людей могут быть заняты одним основанием, а у других — альтернативным. Если ОНП расположены внутри или вблизи генов, то они случайно могут иметь явный фенотипический эффект (например, полиморфизмы, влияющие на цвет волос). Однако в большинстве случаев влияние ОНП гораздо более тонкое, например они могут в малой степени, но аддитивным образом влиять на нашу предрасположенность к заболеваниям или индивидуальную реакцию на некоторые лекарства (см. с. 143). Большинство ОНП расположены вне генов и, по-видимому, никак себя не проявляют. Однако они, тем не менее, могут быть использованы как генетические маркеры. Некоторые ОНП вызывают появление или исчезновение сайтов рестрикции, меняя тем самым набор полос, видимых на саузерн-блоте. Эти **полиморфизмы длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)** были использованы для получения первой полной генетической карты генома человека.

Оставшиеся 5% полиморфизма последовательностей существует в основном в форме **полиморфизмов простых повторов** (simple sequence repeat polymorphisms, SSRPs), которые иначе называют **микросателлитами**. Они представляют собой короткие последовательности, повторенные разное число раз. Наиболее распространенный вид микросателлита — CA_n , где n — число повторов (обычно 5–50). В отличие от ОНП, микросателлиты имеют множество аллелей (т. е. могут встречаться варианты с 12 повторами, 22, 31 и т. д.), в то время как ОНП обычно существует в одной из двух альтернативных форм. Микросателлиты редко встречаются внутри генов, но если все-таки это происходит, то в результате чаще всего возникает заболевание (например, болезнь Хантингтона). Тем не менее широкое распространение микросателлитов позволяет использовать их для получения карт с более высоким разрешением, чем в случае ПДРФ. На стадии физического картирования в проекте «Геном человека» использовалась как основа генетическая карта, полученная с помощью микросателлитных маркеров.

Изученные вариации

Разнообразие характеристик человека в течение многих лет использовалось в судебной медицине, но интерес к **геномным вариациям** начал возрастать только по мере того, как проект «Геном человека» стал набирать ход. Глобальные усилия для изучения многообразия ДНК человека были инициированы в 1991 г. при попытке начать проект «Разнообразие» («изменчивость») ге-

нома человека (HGDP) как ответвление HGP. Однако этот проект получил малую финансовую поддержку, поскольку его первоначальная цель заключалась в поиске маркеров, характерных для различных этнических групп, с целью изучения популяционной истории и происхождения человека. Гораздо большую поддержку, государственную и частную, получили проекты по картированию с помощью ОНП, поскольку их результаты имели практическую значимость для медицинских исследований. Возможность устанавливать ассоциации между ОНП и предрасположенностью к заболеваниям должна заметно ускорить процесс выявления генов, ответственных за болезни, а ассоциации между ОНП и ответами организма на лекарственные препараты лежит в основе нового медицинского направления — **фармакогеномики**, где лекарства можно было бы подбирать больным индивидуально, основываясь на их генотипе (см. гл. 4). В 1999 г. **Международный консорциум по ОНП** дал старт проекту, направленному на систематическое картирование ОНП, что позволило к 2001 г. создать карту, содержащую около полутора миллиона ОНП. Совсем недавно было показано, что группы ОНП имеют тенденцию наследоваться совместно в виде **гаплотипных блоков** с низким уровнем рекомбинации внутри них. В результате, по предварительной оценке, 10 млн ОНП могут быть представлены в виде всего лишь 200 тыс. гаплотипов, что упрощает процесс установления их ассоциаций с заболеваниями. В октябре 2001 г. стартовал Международный проект ХарМар, имеющий целью картирование гаплотипов по всему геному.

До начала проекта «Геном человека» были сконструированы генетические карты низкого разрешения с использованием **полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ)**. Они были основаны на природно существующих вариациях, которые приводят к появлению или исчезновению сайтов для ферментов рестрикции и поэтому генерируют различающиеся по длине полосы на картинах блот-гибридизации по Саузерну (рис. 2-1). Проблема с ПДРФ-локусами состояла в том, что их не так много и они расположены друг от друга слишком далеко, чтобы быть достаточными для использования в конструировании физической карты: первая ПДРФ-карта имела чуть более 400 маркеров и разрешение 10 сМ (сантиморганид), что

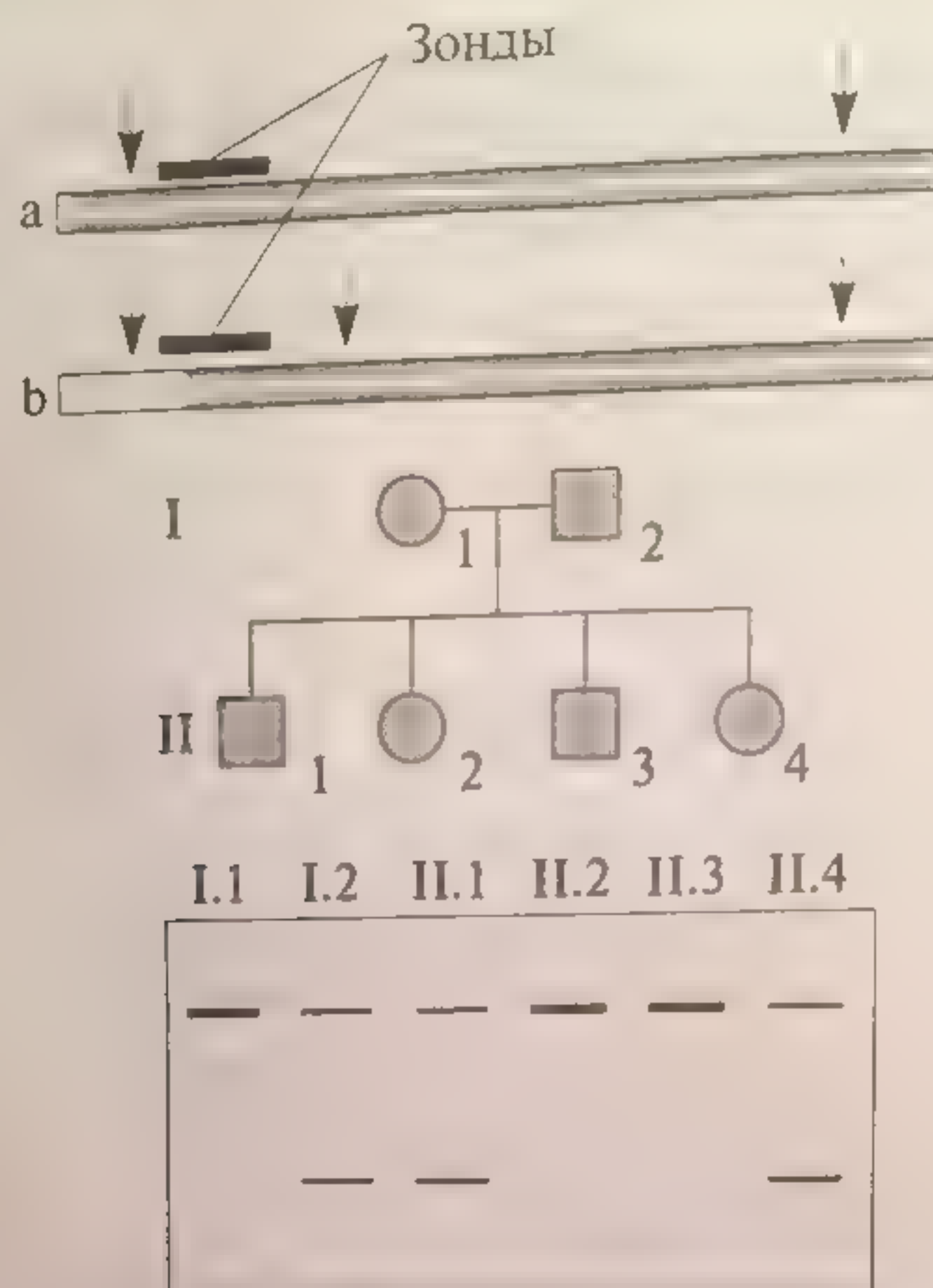


Рис. 2-1 Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) — варианты последовательностей, обеспечивающие появление или исчезновение сайтов рестрикции и меняющие таким образом длину рестрикционного фрагмента, определяемого с помощью специфического зонда. *Вверху* — два альтернативных аллеля, для которых длина рестрикционного фрагмента, детектируемого с помощью специфического зонда, варьирует в зависимости от наличия или отсутствия среднего из трех сайтов рестрикции (отмеченных вертикальными стрелками). Таким образом, аллели а и б дают на саузерн-блотах (*внизу*) гибридизационные полосы, различающиеся по длине. Это дает возможность следить за аллелями в семейной родословной. Например, ребенок II.2 наследует две копии аллеля а, по одной от каждого родителя, в то время как ребенок II.4 наследует одну копию аллеля а и одну копию аллеля б. Отметим сходство этого метода с методом обнаружения аллелей, ответственных за болезнь, таких как вариации β -глобина в случае серповидноклеточной анемии (рис. 1-5). По сути единственное различие в том, что ПДРФ гораздо более распространены в популяции, чем связанные с болезнью мутации, поскольку первые не оказывают явного и значительного влияния на человеческий фенотип.

эквивалентно одному маркеру на каждые 10 Мб ДНК. Прорыв в создавшейся ситуации произошел в результате открытия новых полиморфных маркеров, известных как **микросателлиты**, которые обильно представлены в геноме (рис. 2-2). К 1992 г. с помощью микросателлитов была получена генетическая карта с разрешением в 1 сМ (эквивалентно 1 маркеру на каждые 1 Мб ДНК), которую можно было использовать в качестве основы для физического картирования. Однако усилия по генетическому картированию на этом не остановились. К 1996 г. была опубликована карта с разрешением 0,5 сМ, включающая дополнительные микросателлитные маркеры. И наконец карта, выпущенная в 2002 г. консорциумом deCODE в Исландии, имела разрешение 0,2 сМ и включала более 5000 маркеров. В рамках проектов по ОНП и гаплотипам также были созданы образцы генетических карт высокого разрешения (дополнение 2-4).

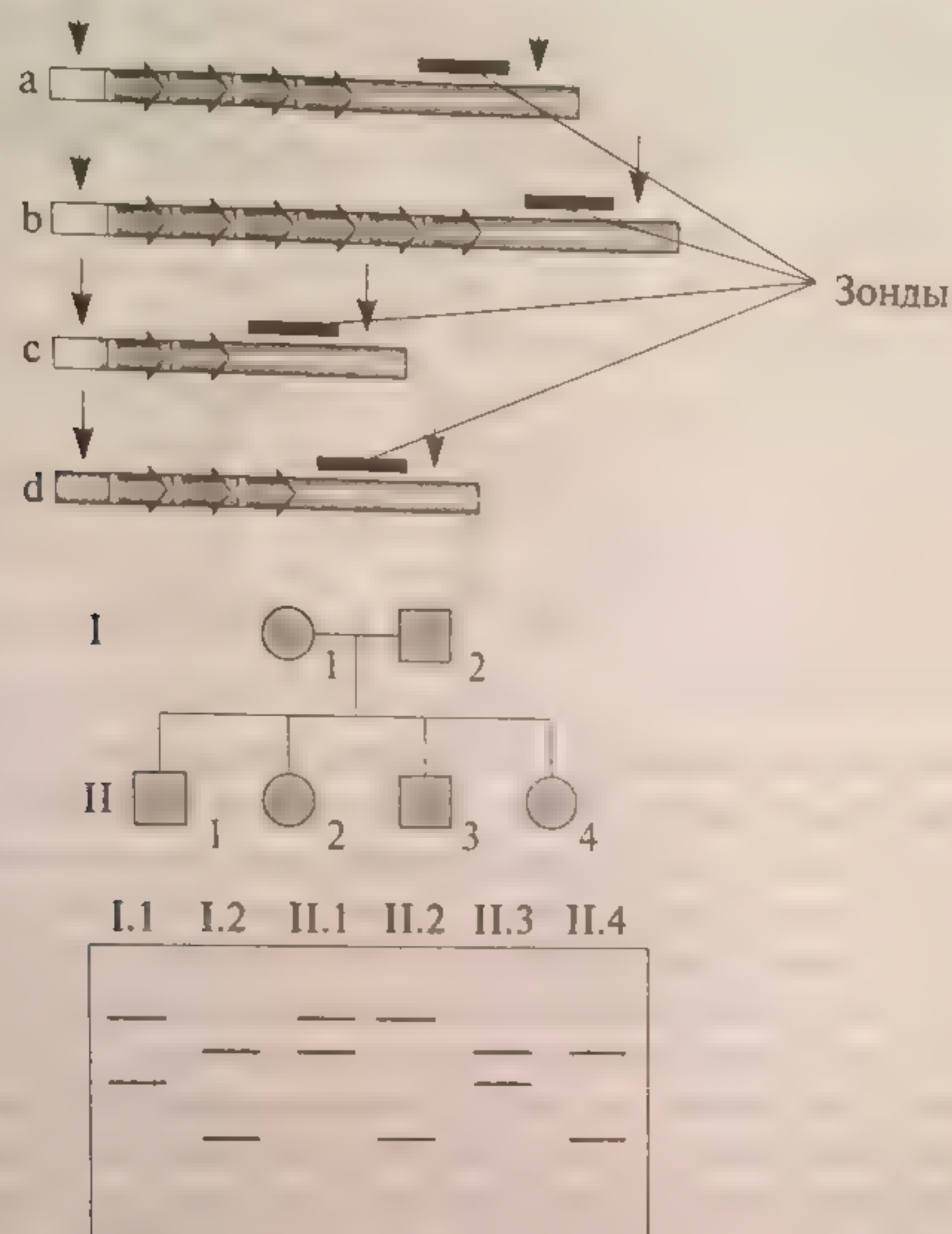


Рис. 2-2 Микросателлиты представляют собой варианты последовательностей, которые приводят к различиям в длине рестрикционных фрагментов или ПЦР-копий из-за разницы в числе копий коротких повторяющихся последовательностей размером 1–12 п. н. *Вверху* — четыре разных аллеля, у которых длина рестрикционного фрагмента, детектируемого специфическим зондом, варьирует из-за разницы в числе tandemных повторов. Все четыре аллеля дают полосы разной длины на саузерн-блотах (*внизу*) или продукты ПЦР разного размера (не показано). Микросателлиты в отличие от ПДРФ характеризуются множественным аллелизмом, что позволяет проследить точный характер наследования. Например, в родословной мать и отец имеют аллели b/d и a/c соответственно (меньшие по размеру фрагменты движутся быстрее при электрофорезе). Первый ребенок II.1 унаследовал аллель b от матери и аллель a от отца.

Революция в физическом картировании

В отличие от генетических карт **физические карты** построены на основе реальных блоков ДНК и поэтому обеспечивают соответствующую базу для секвенирования. Стадия физического картирования в рамках проекта HGP включает создание библиотек геномной ДНК (см. гл. 1), а также идентификацию и сборку перекрывающихся клонов для создания **контигов** — непрерывных серий клонов, представляющих собой соприкасающиеся фрагменты, полностью охватывающие какой-либо участок генома. В начале реализации проекта HGP самыми емкими векторами, пригодными для клонирования, были **космиды**, позволяющие встраивать фрагменты чужеродной ДНК размером до 40 тыс. н. п. Поскольку для сборки физической карты необходимо было провести

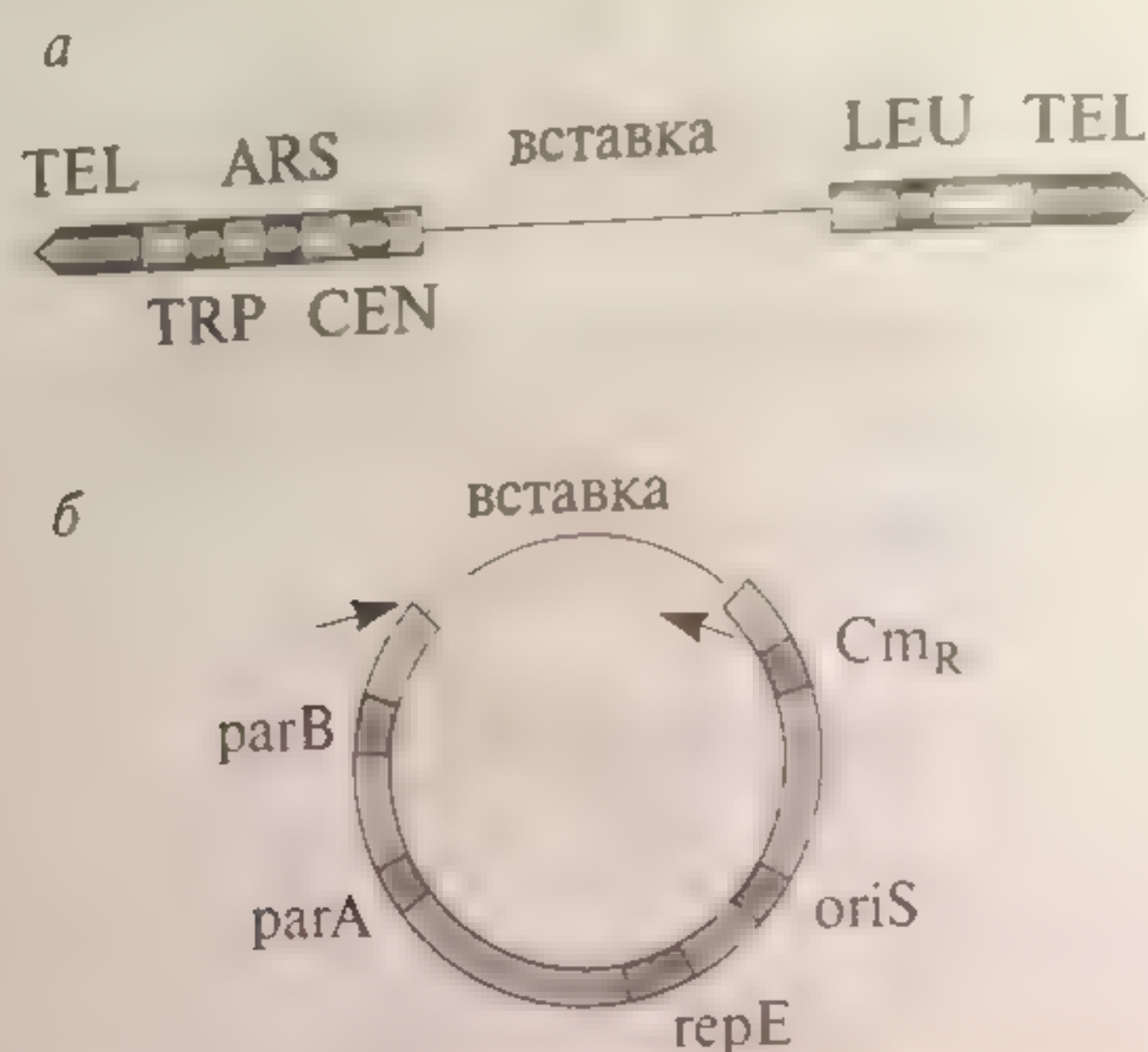


Рис. 2-3 Два вектора, основанные на искусственных хромосомах, сыгравшие важнейшую роль в процессе реализации проекта «Геном человека». *а* — дрожжевая искусственная хромосома, максимальный размер удерживаемой вставки достигает 2 Мб. TEL — теломера; TRP — селективный маркер — один из генов биосинтеза триптофана; ARS — дрожжевой сайт инициации репликации (автономно реплицирующаяся последовательность); CEN — последовательность, выполняющая центромерную функцию; LEU — селективный маркер — один из генов биосинтеза лейцина; *б* — бактериальная искусственная хромосома, максимальный размер удерживаемой вставки достигает 200 тыс. п. н. Cm_R — маркер устойчивости к антибиотику; oriS/repE — последовательности, необходимые для репликации; parA/parB — последовательности, необходимые для регуляции числа копий вектора. Стрелками указаны промоторы для РНК-полимераз Т3 и Т7, которые используются для получения меченых зондов, соответствующих концевым последовательностям вставки.

скрининг сотен тысяч космидных клонов, появилась насущная потребность в векторах для клонирования больших вставок, которые уменьшили бы объем работы. Необходимо также было разработать новые подходы к выявлению перекрывающихся фрагментов и сборке контигов на геномной основе.

Что касается технологии клонирующих векторов, то успех пришел с разработкой векторов на основе искусственных хромосом, которые могли включать очень большие вставки (рис. 2-3). Первыми такими векторами были дрожжевые искусственные хромосомы (YACs), способные нести вставки размером более 1 Мб. Такая способность уменьшала число клонов, требуемых для покрытия всего генома, до 10 тыс. Однако имелась одна проблема с векторами YACs, которая состояла в их тенденции включать в себя химерные вставки (т. е. вставки, представляющие собой фрагменты ДНК из двух или более не прилегающих друг к другу участков генома). Поэтому для создания окончательных физических карт, пригодных для начала секвенирования, требовались более точные векторы. Векторы BAC (бактериальные искусственные хромосомы) и PAC (искусственные хромосомы P1) были выбраны благодаря их размерам (200–300 тыс. п. н.).

Были разработаны различные методы (см. ниже) сборки ДНК-клонов в контиги; все они подразумевают выявление перекрываний между прилегающими друг к другу клонами.

- «Прогулка по хромосоме». Метод был широко использован для позиционного клонирования (см. с. 23) и включает последовательное использование клонированных фрагментов в качестве гибридизационных зондов для идентификации перекрывающихся фрагментов (см. рис. 1-3). В другом варианте: концевые последовательности каждого клонированного фрагмента могут быть использованы для конструирования пары праймеров, и тогда перекрывающиеся ДНК-клоны могут быть обнаружены с помощью ПЦР.

- **Фингерпринтирование с помощью ферментов рестрикции.** Метод включает расщепление клонированных фрагментов наборами ферментов рестрикции. Два перекрывающихся ДНК-клона имеют существенное число идентичных рестрикционных фрагментов. Обычно наблюдаемая картина достаточно сложна и должна быть интерпретирована с помощью компьютерной обработки (рис. 2-4).

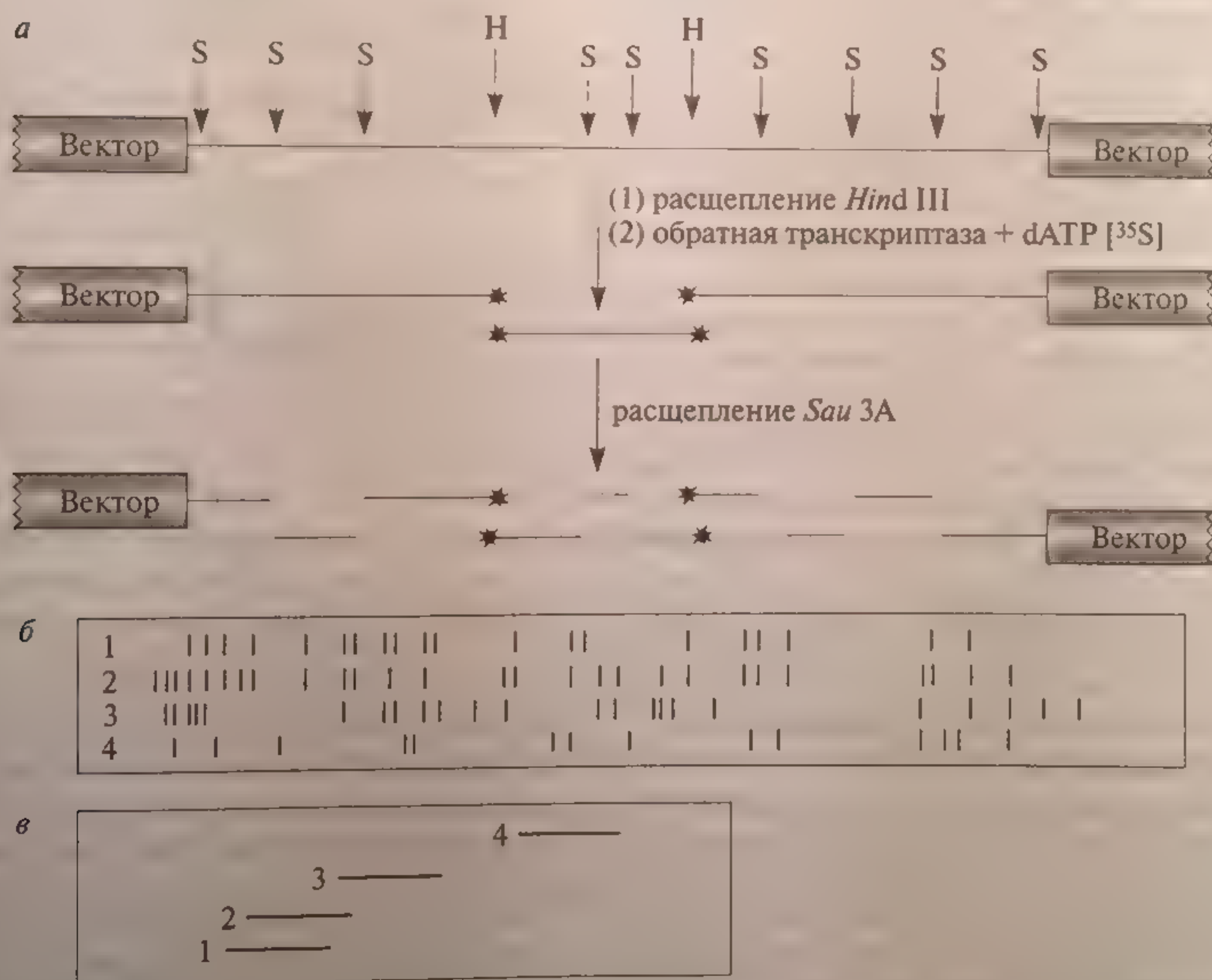


Рис. 2-4 Принцип фингерпринтирования ферментами рестрикции. *а* — получение меченых рестрикционных фрагментов (см. подробности в тексте); *б* — наборы полос при электрофоретическом разделении фрагментов четырех различных ДНК-клонов. Хорошо видно наличие значительного количества одинаковых полос для ДНК-клонов 1, 2 и 3, что говорит об их перекрывании, в то время как ДНК-клон 4 не перекрывается с остальными и имеет лишь несколько общих с другими клонами полос; *в* — карта контигов, полученная на основании электрофоретического разделения (*б*).

Дополнение 2-5 Опорная STS-карта генома человека

Специфические маркерные последовательности (STS — от *англ.*) — уникальные последовательности генома длиной 100–200 п. н., легко детектируемые с помощью ПЦР. Опорная (реперная) физическая карта генома человека была опубликована в 1995 г. и включала 15000 STS-маркеров, расстояние между которыми в среднем составляло около 200 тыс. п. н. Карта была использована как основа для сборки контигов фрагментов из BAC- и PAC-клонов, а также для выявления перекрывающихся участков между соседними ДНК-клонами. Как получают STS-маркеры и каким образом создают карту?

Существует три основных источника STS-маркеров:

- Некоторые микросателлитные маркеры были извлечены из генетической карты. Микросателлиты могут использоваться как STS-маркеры лишь в том случае, если помимо повторяющейся последовательности, они содержат какую-нибудь уникальную последовательность.

- Случайное секвенирование клонов из библиотек кДНК дает частичные последовательности кДНК, известные как **маркеры экспрессируемых последовательностей (ESTs — от *англ.* Expressed sequence tags)**. Они могут быть использованы как STS-маркеры в том случае, если соответствуют уникальным генам (а не семействам генов).

- Остальные STS-маркеры по происхождению являются уникальными последовательностями случайных геномных клонов.

Для решения сложной проблемы картирования STS-маркеров друг относительно друга использовался метод **радиационных гибридов** (панели радиационных гибридов). Это классический метод физического картирования, при котором человеческие клетки убивают облучением и производят их слияние с клетками грызунов, в которых и происходит размножение отдельных фрагментов человеческих хромосом. Наборы клеток (панели), содержащих различные фрагменты человеческих хромосом, могут быть проанализированы на присутствие STS-маркеров с помощью ПЦР. Как и в случае генетического картирования, чем ближе два маркера расположены друг к другу,

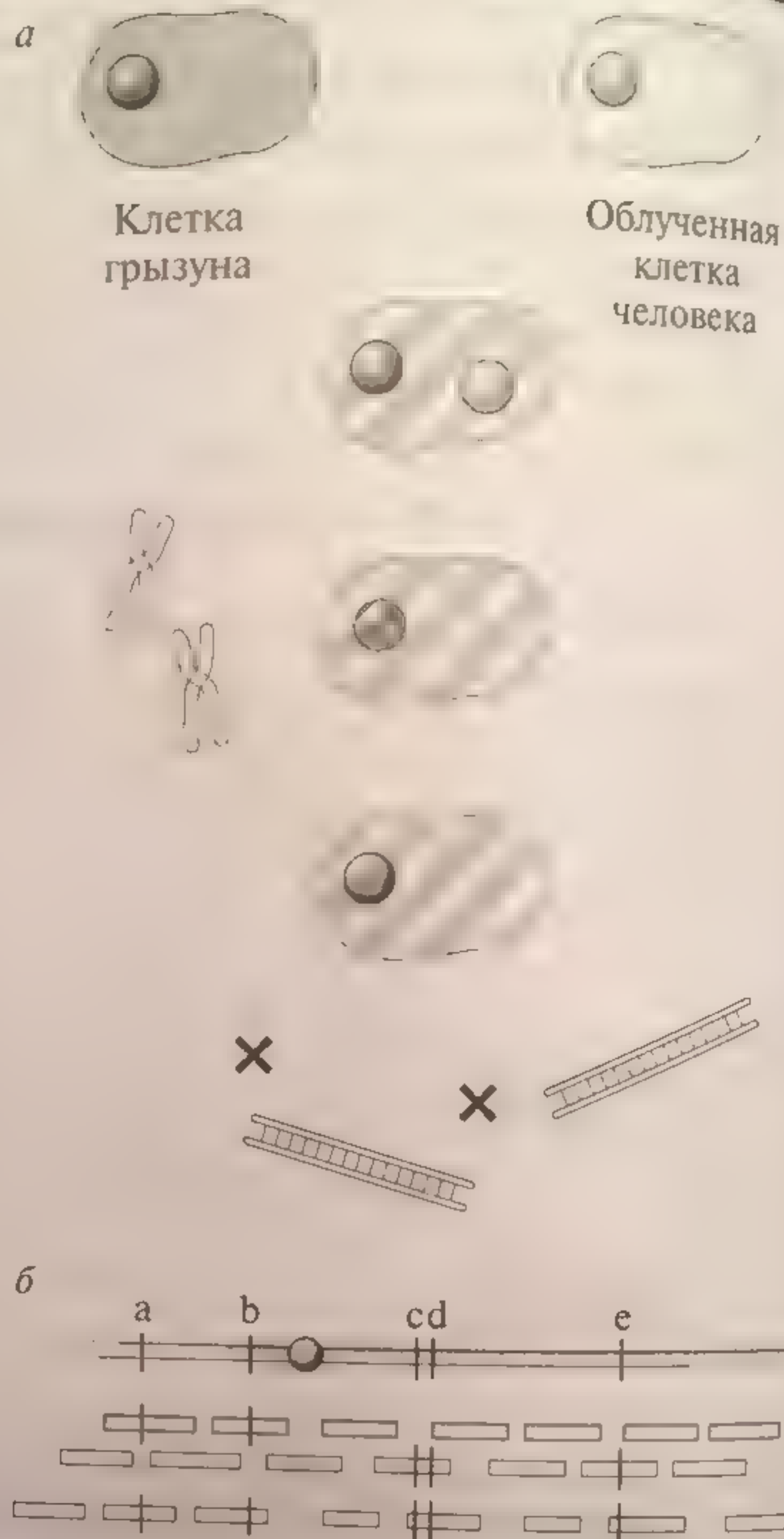


Рис. Д2-5 а — картирование с использованием радиационных гибридов. Клетки грызуна (хомяка) и убитые облучением клетки человека подвергают слиянию с целью получения гетерокарионов (клеток с двумя ядрами). Образуется гибридное ядро, из которого удаляются поврежденные человеческие хромосомы. В результате получается клетка грызуна, содержащая один или несколько фрагментов человеческих хромосом. Могут быть созданы панели (группы) таких гибридов, в которых представлен весь геном человека. Систематический анализ таких панелей на присутствие STS-маркеров позволяет построить опорную физическую карту; **б** — эту карту можно усовершенствовать и подтвердить путем анализа присутствия этих маркеров во вставках, извлеченных из YAC-клонов.

тем меньше вероятность что они будут разделены (в этом случае хромосомной фрагментацией, а не кроссинговером). Следовательно, анализ множества гибридных клеток с целью выявления тех маркеров, которые присутствуют одновременно на

одном и том же хромосомном фрагменте, позволяет упорядочить маркеры (рис. Д2-5а). Это подтвердилось анализом на присутствие двух или более прилегающих друг к другу STS-маркеров в библиотеках на основе вектора YAC (рис. Д2-5б).

- **Фингерпринтирование с помощью повторяющихся ДНК.** В продолжение описанного выше метода можно провести блот-гибридизационный анализ по Саузерну рестрикционных фрагментов с использованием в качестве зондов широко распространенных в геноме повторяющихся последовательностей, таких как *Alu*. Существует более миллиона копий *Alu*-элементов, диспергированных по геному (одна копия на каждые 4 тыс. п. н.), так что типичная вставка ВАС-клона размером 100 тыс. п. н. содержат 20–30 таких повторов. Перекрывающиеся клонированные фрагменты будут содержать значительное количество одинаковых гибридизационных полос. Кроме того, может быть использован фингерпринтинг на основе ПЦР с применением повторяющихся ДНК.

- **STS-картирование.** STS (от англ. Sequence tagged site, маркерная последовательность, сиквенсный ярлык) — это уникальная последовательность в геноме длиной 100–200 п. н., которая легко может быть обнаружена с помощью ПЦР. Если два клон имеют один и тот же STS-маркер, то они перекрываются и могут быть объединены в контиг. В рамках проекта HGP STS-картирование было наиболее ценной стратегией для сборки контигов, поскольку в 1995 г. была опубликована эталонная **физическая карта**, содержащая 15000 STS-маркеров, находящихся друг от друга на расстоянии в среднем 200 кб (дополнение 2-5). Таким образом клоны, содержащие конкретные STS-маркеры, могут быть закреплены на эталонной карте с указанием их точной хромосомной локализации не только в связи с их отношением к другим клонам. Очень важно, что некоторые из STS-маркеров содержали полиморфные микросателлитные последовательности, позволяющие использовать их в качестве двойных генетических маркеров и объединять в генетической карте. Существуют также **маркеры экспрессируемых последовательностей** (EST — от англ. Expressed sequence tags), получаемые из клонов кДНК и, таким образом, позволяющие устанавливать положение генов. Значимость маркеров ESTs в картировании генов обсуждается ниже.

Стратегия секвенирования

Все проекты по расшифровке клеточных геномов базировались на фундаментальной технологии секвенирования методом терминаторов, принцип которого объясняется на рис. 2-5. Однако даже с помощью самого совершенного прибора трудно получить за одну реакцию хороша прочитанную последовательность длиной более 600–700 нуклеоти-

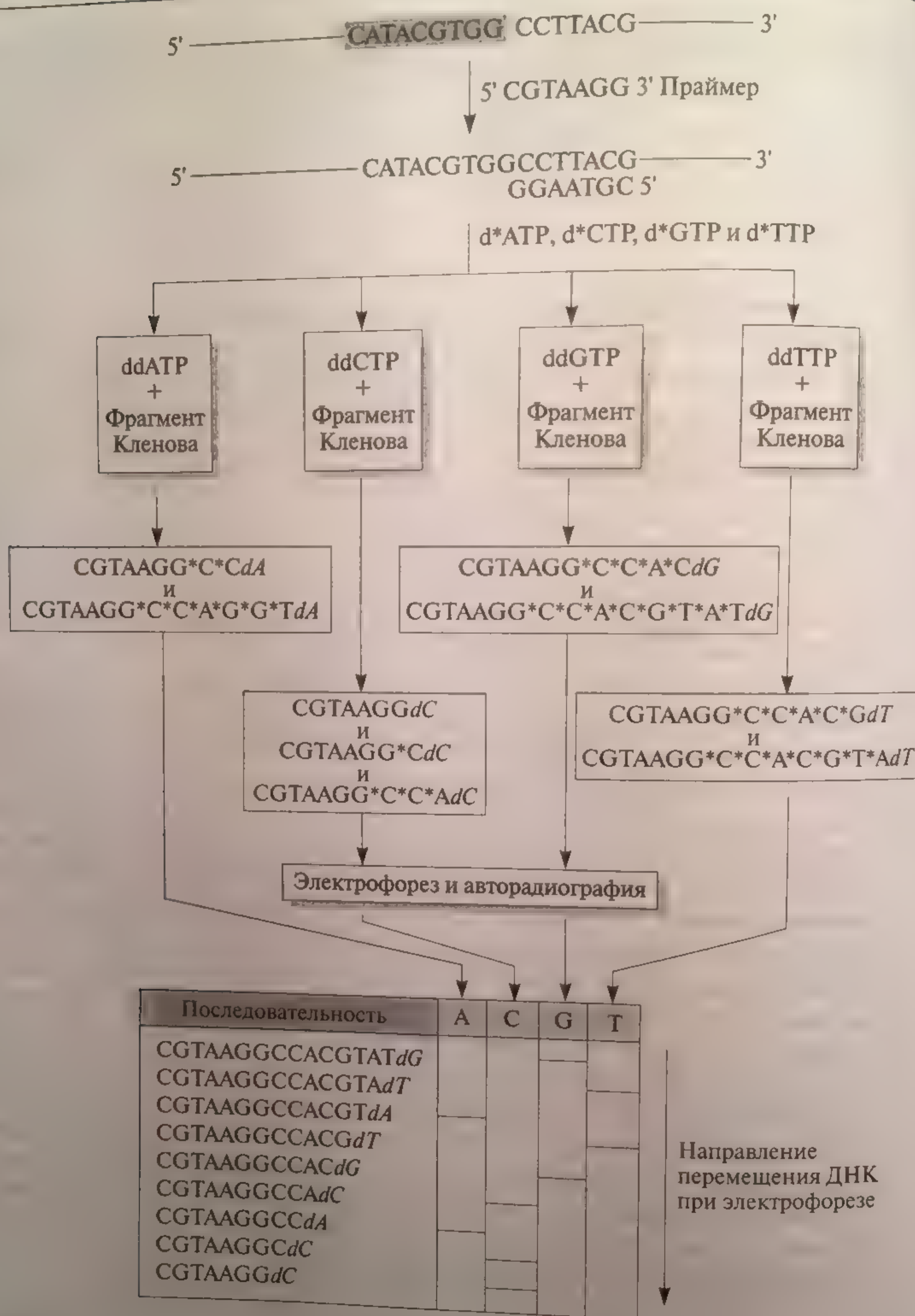


Рис. 2-5 Секвенирование ДНК с использованием дидезоксинуклеозидтрифосфатов в качестве терминаторов. Звездочкой обозначено положение ^{32}P -метки, а префикс "d" указывает на присутствие дидезоксинуклеотида. Секвенируемая последовательность радиоизотопной метки, то самая короткая полоса, соответствующая последовательно- сти CGTAAGGdC, не будет обнаруживаться радиоавтографией, поскольку не произош- ло встраивания меченого нуклеотида.

дов. Следовательно, чтобы определить последовательность большой вставки в ВАС- или РАС-векторе (до 200 тыс. п. н.), ее следует разбить на более короткие фрагменты, и секвенировать их по отдельности. Это обычно достигается путем случайного разрезания вставки на фрагменты длиной 1–2 тыс. п. н. Далее все данные по секвенированию вводятся в компьютер, который может искать перекрытия и снова собирать полную последовательность исходной вставки с использованием специальной программы (алгоритма), например PHRAP. Этот подход называется **методом дробовика**.

В рамках проекта HGP использовался «иерархический метод дробовика»: одновременное секвенирование методом дробовика нескольких фрагментов из индивидуальных ВАС-клонов. Поскольку на этой стадии проекта каждый ВАС-клон уже был картирован физически, положение последовательности на эталонной физической карте могло быть определено достаточно легко. В 1999 г. в США биотехнологическая компания Celera Genomics, финансируемая из частных фондов, предприняла попытки секвенировать человеческий геном с использованием альтернативного подхода — метода полногеномного дробовика. При таком подходе секвенирование методом дробовика проводили на всей геномной ДНК. Никакого картирования не проводилось. Вместо него использовались мощные компьютеры для сборки всего генома из прочтения коротких 600–700-звенных нуклеотидных последовательностей. Координатор проекта Крэйг Вентер использовал в 1995 г. геномный вариант метода дробовика для расшифровки первого клеточного генома. Он подтвердил применимость этого метода для сложного эукариотического генома, приняв участие в объединенном «частно-общественном» проекте по секвенированию эухроматической части генома *Drosophila melanogaster* (табл. 2-2). Метод дробовика «клон за клоном» и полногеномный метод сравниваются на рис. 2-6. В целом метод «клон за клоном» не такой быстрый из-за необходимости предварительного картирования и упорядочивания ДНК-клонов, но он гораздо проще на завершающей стадии, так как иерархическая сборка последовательности не требует больших вычислительных ресурсов. Напротив, хотя метод дробовика для всего генома производит данные по секвенированию быстро, однако стадия сборки единой последовательности гораздо более затруднена, особенно из-за высокого содержания повторяющейся ДНК в геноме человека (рис. 2-7). Действительно, есть основания полагать, что для завершения первой, черновой, версии последовательности генома человека Celera опиралась на карты и данные по секвенированию, полученные в рамках проекта HGP (все это было в свободном доступе через Интернет). Финансируемый государственными организациями HGP и частный проект Celera сделали совместное заявление о завершении черновой версии геномной последовательности в 2000 г. (через 8 месяцев ими были опубликованы отчеты о полученных результатах в специальных выпусках журналов *Nature* и *Science*), а полностью последовательности были закончены в 2003 г. (дополнение 2-6).

Таблица 2-2 «Календарь» основных результатов проекта HGP

Год	Организм	Размер генома	Комментарии
1977	Бактериофаг φX174	5,38 кб	Первый секвенированный геном. Демонстрация возможностей метода секвенирования (метод терминаторов), который преимущественно использовался в последующих геномных проектах
1995	<i>Haemophilus influenzae</i>	1,8 Мб	Первый секвенированный клеточный геном, первый бактериальный геном и первый человеческий патоген. Полная последовательность генома была получена быстрее чем за 3 месяца с использованием метода «дробовика»
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	0,58 Мб	Самый малый известный клеточный геном
1996	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12 Мб	Первый эукариотический геном, важный модельный организм. Вдохновляющий пример международного сотрудничества
	<i>Methanococcus jannaschii</i>	1,66 Мб	Первый геном архей
1997	<i>Escherichia coli</i>	4,7 Мб	Наиболее важный представитель бактериальных моделей. Секвенирован двумя научными группами независимо
1998	<i>Caenorhabditis elegans</i>	97 Мб	Первый секвенированный геном многоклеточного организма и первый геном животного
2000	<i>Drosophila melanogaster</i>	165 Мб	Модельный организм, важный для изучения биологии человека. В секвенировании участвовали организации, имеющие государственное и частное (Celera) финансирование
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	125 Мб	Первый геном растений
2001	<i>Homo sapiens</i>	3000 Мб	Геном человека, секвенированный независимо государственным консорциумом HGP и компанией Celera
2002	<i>Fugu rubripes</i>	400 Мб	Геном представителя семейства кузовковых. Самый малый из секвенированных геномов позвоночных, содержит наименьшее количество повторяющейся ДНК; может быть полезен для идентификации генов человека
2003	<i>Mus musculus</i>	2800 Мб	Мышь — модельный организм млекопитающих, широко используемый для изучения человеческих болезней (см. гл. 8); секвенирован геном ближайшего к человеку организма
	<i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Anopheles gambiae</i>		Секвенирован первый геном эукариотического паразита — малярийного паразита (<i>P. falciparum</i>). Особое значение имеет то, что одновременно была опубликована последовательность генома носителя этого паразита, комара <i>A. gambiae</i>

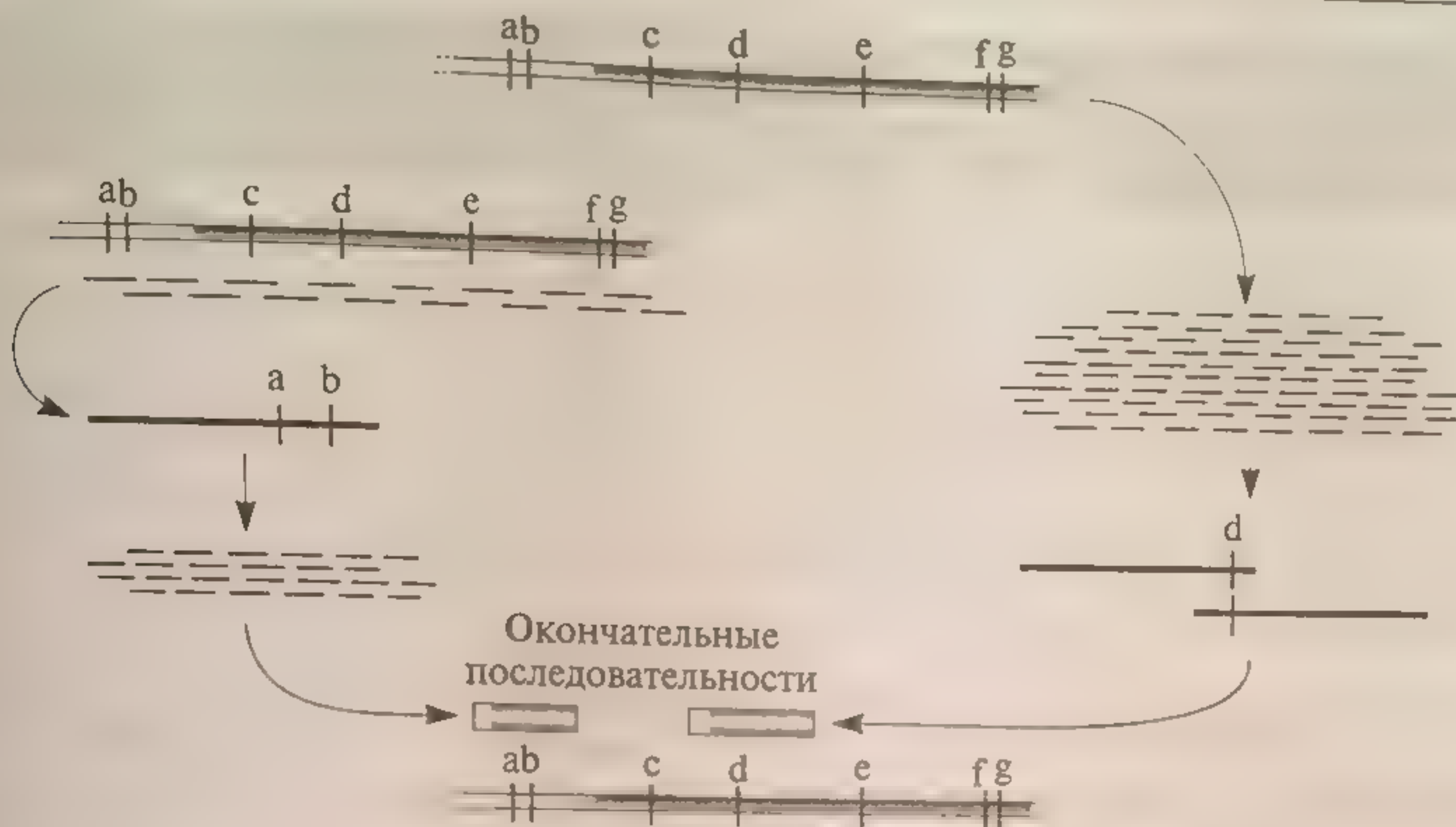


Рис. 2-6 Стратегия секвенирования генома. *Вверху* — участок геномной ДНК длиной 2–3 Мб с семью физическими маркерами, такими как STS (уникальные последовательности), обозначенными вертикальными линиями. При использовании подхода «клон за клоном» (*слева*) фрагменты геномной ДНК клонируют в векторах ВАС, а затем последовательности вставок упорядочивают путем выявления перекрывающихся областей и располагают на опорной физической карте с использованием маркеров. Из перекрывающихся ВАС-вставок собирают минимальную по размеру конструкцию, охватывающую полностью участок генома. Индивидуальные ВАС-вставки (*слева*; соответствуют маркерам а и b) затем секвенируют методом дробовика, разбивая их на случайные фрагменты меньшего размера. Последовательность снова собирают с помощью компьютера и окончательную структуру наносят на карту. В случае использования метода дробовика для всего генома (*справа*) геномную ДНК разбивают на более мелкие фрагменты, секвенируют их и с помощью компьютера собирают полную последовательность. Для малых геномов опорная карта не нужна, а для геномов большего размера, таких как геном человека, для того, чтобы правильно собрать последовательность необходимо использовать имеющиеся данные по картированию.

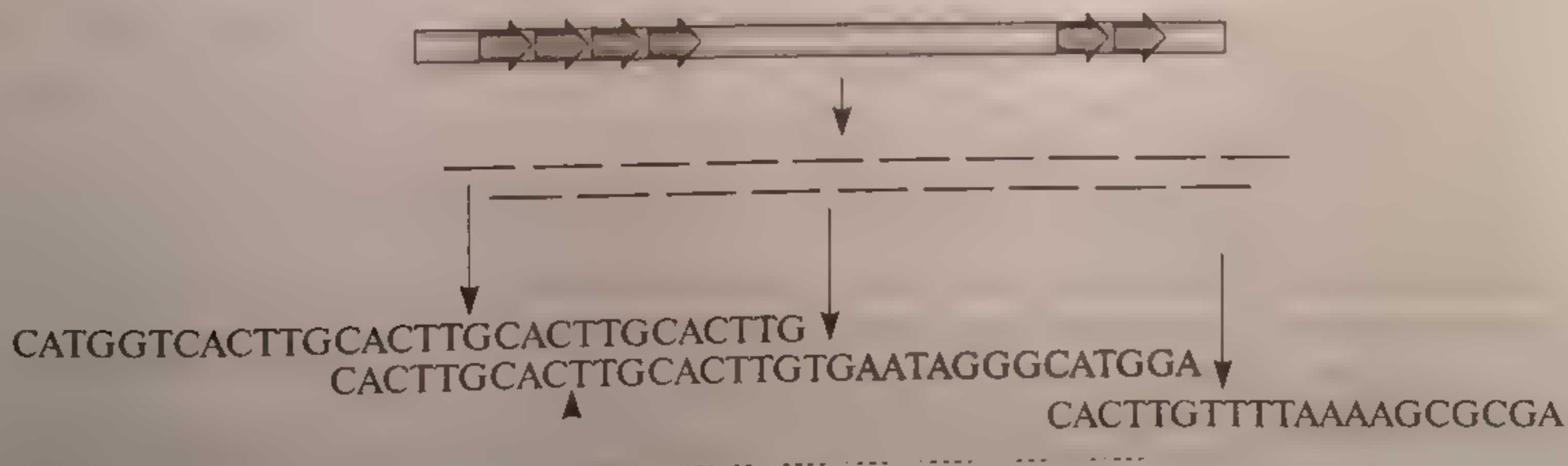


Рис. 2-7 Проблемы, связанные с наличием повторяющихся последовательностей в ДНК. *Вверху* — ДНК-вставка в ВАС-клоне, содержащая удаленные друг от друга тандемные повторы. Когда эту вставку секвенируют методом дробовика, повторы могут привести к ошибкам при упорядочивании последовательностей. Например (*слева*), два внутренних повтора в кластере могут быть потеряны из-за неправильного перекрытия между прилегающими к этим внутренним повторам участками. В случае удаленных друг от друга повторов неправильное перекрытие может привести к потере уникальной последовательности ДНК, которая может содержать гены.

Дополнение 2-6 «Черновые» варианты последовательности

В опубликованных в феврале 2001 г. сообщениях о завершении черновых вариантов последовательности генома человека говорилось как о грандиозном научном достижении. Однако последовательности охватывали не более 90% генома, а многие данные требовали уточнения. Что необходимо сделать, чтобы превратить «черновой» вариант в окончательный?

Гетерохроматин

Большая часть недостающей последовательности представляет собой **гетерохроматин** — плотно упакованную ДНК, включающую преимущественно центромерные районы хромосом. Он состоит из больших блоков тандемных повторов, которые, как известно, чрезвычайно трудно клонировать. Вполне вероятно, что гетерохроматин ДНК никогда не будет доступна и последовательность человеческого генома никогда не будет расшифрована полностью. Однако поскольку в гетерохроматине найдено не так уж много генов, то указанное обстоятельство скорее всего никак не повлияет на возможность использования данных по структуре генома в медицине.

Пробелы

Пробелы возникают во всех проектах по секвенированию из-за **ошибок выборки**. Можно провести аналогию с сумкой, содержащей 100 камешков, из которой при случайном отборе каждый камешек нужно достать хотя бы один раз. Всегда существует вероятность, что один или два камешка смогут «избежать» такой участи, а другие будут отобраны несколько раз. Ошибки выборки возникают во время конструирования

библиотек (некоторые части генома не представлены в библиотеках) и на стадии секвенирования (оказывается, что некоторые последовательности просто не были выбраны для секвенса). Подходы к ликвидации пробелов включают использование множественных геномных библиотек, а также амплификацию геномной ДНК с применением ПЦР-праймеров, комплементарных концевым участкам известных контигов. В «черновых» вариантах последовательности генома около 50 тыс. пробелов.

Незавершенная последовательность

Результаты автоматического секвенирования представляются в виде **сиквенсной «картинки»** — ряда пиков, соответствующих различным основаниям (рис. Д2-6). Чтобы избежать неминуемых ошибок, каждую часть генома независимо секвенируют 8–10 раз, прежде чем объявить ее завершенной. Качество последовательности оценивается с использованием компьютерной программы, такой как PHRED, которая присваивает каждому пику определенный «вес». Если, согласно оценке, последовательность оказывается низкого качества, ее отклоняют и секвенируют заново. В «черновых» вариантах генома, полученных как консорциумом HGP, так и компанией Celera, только 25% последовательностей можно считать завершенными.

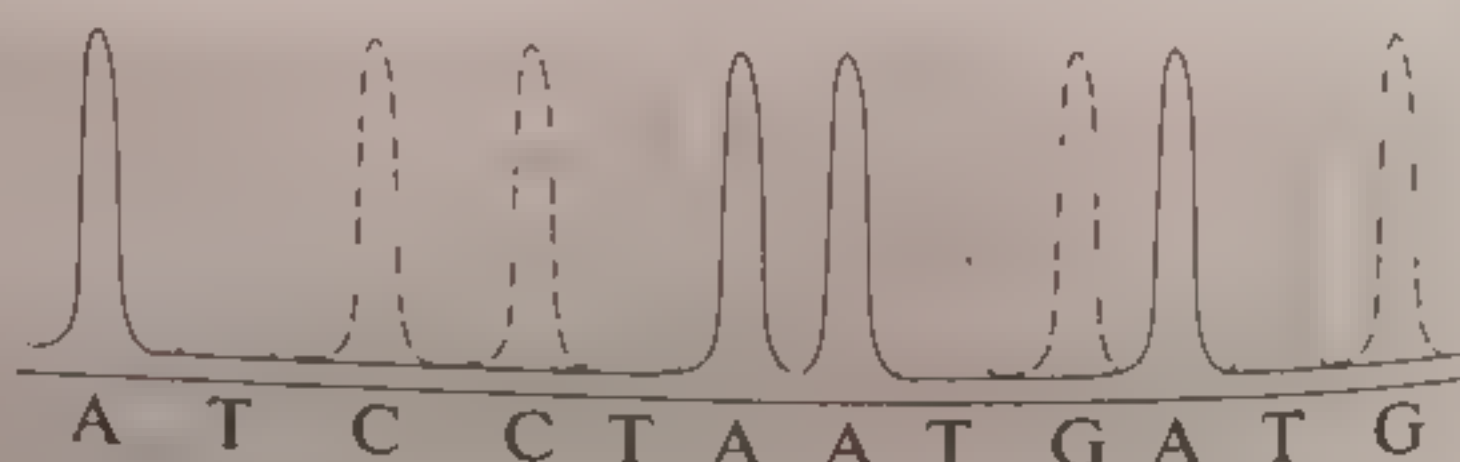


Рис. Д2-6 Сиквенсная «картинка».

Аннотирование генома

Первая задача, возникающая после установления последовательности любого генома — это его описание (**аннотирование**), т. е. извлечение из имеющейся последовательности полезной биологической информации. В сущности, это означает поиск генов и их регуляторных элементов, кото-

рые представляют собой функциональные компоненты генома и очень важны с точки зрения медицины.

С самого начала реализации проекта HGP наибольшее внимание вызывали структурные гены, что выражалось в высокопроизводительном (массовом) секвенировании кДНК-клонов для создания больших коллекций EST-маркеров. Как уже упоминалось ранее, EST — это фрагменты кДНК длиной 100–200 п. н., полученные одноразовым секвенированием клонов, случайным образом выбранных из библиотек кДНК (в то время как для получения окончательной версии последовательности ее секвенируют 8–10 раз). Следовательно, будучи короткими и не совсем точными, EST обеспечивают быстрый и недорогой путь к идентификации последовательностей генов, а кроме того, они являются полезными маркерами при физическом картировании. Около 100 тыс. EST-маркеров было локализовано на карте генома путем типирования радиационных гибридов и YAC-клонов (дополнение 2-5). Конечно, не все эти последовательности представляют собой индивидуальные гены, и были предприняты попытки идентификации уникальных наборов генов путем комбинирования перекрывающихся EST (например, UniGene Project; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>). Первые достаточно полные генетические карты были получены в 1996 г., и они указывали на наличие около 20–30 тыс. генов. В то время считалось, что это очень маленькая часть каталога человеческих генов.

В 2001 г., когда стала доступна последовательность генома, ожидали обнаружения существенного числа новых генов. Но ко всеобщему удивлению общее число генов оказалось гораздо меньше, чем ожидалось. По современным оценкам, в геноме человека около 30 тыс. генов, что лишь на 50% больше, чем у нематод *Caenorhabditis elegans*. Точное число невозможно установить с полной уверенностью, поскольку некоторые гены трудно идентифицировать. Ген можно предсказать, если

- существуют доказательства, что последовательность экспрессируется.
- последовательность гомологична известному гену или EST (либо человека, либо других организмов).
- последовательность содержит какой-то признак, например промотор, участок сплайсинга, участок полиаденилирования или нуклеотидную последовательность, позволяющую предположить существование экзона.

Для поиска генов *ab initio* и на основании гомологии используют компьютерные программы. Это дает простор как для переоценки, так и недооценки числа генов. Например, ген может быть предсказан неверно, если последовательность обнаруживает сильную гомологию с известным геном, но на самом деле является псевдогеном (остатком нефункционирующего гена), или если предсказание было сделано на основании последовательности кДНК, которая на самом деле является артефактом (геномные последовательности могут случайно оказаться в числе кДНК-клонов во время конструирования библиотеки). В то же время истинные гены могут быть пропущены, если они экспрессируются на очень низком уровне или лишь в ограниченных клеточных популяциях (тогда они очень редко встречаются в кДНК-библиотеках). Кроме того, пропуск возможен, если характерные

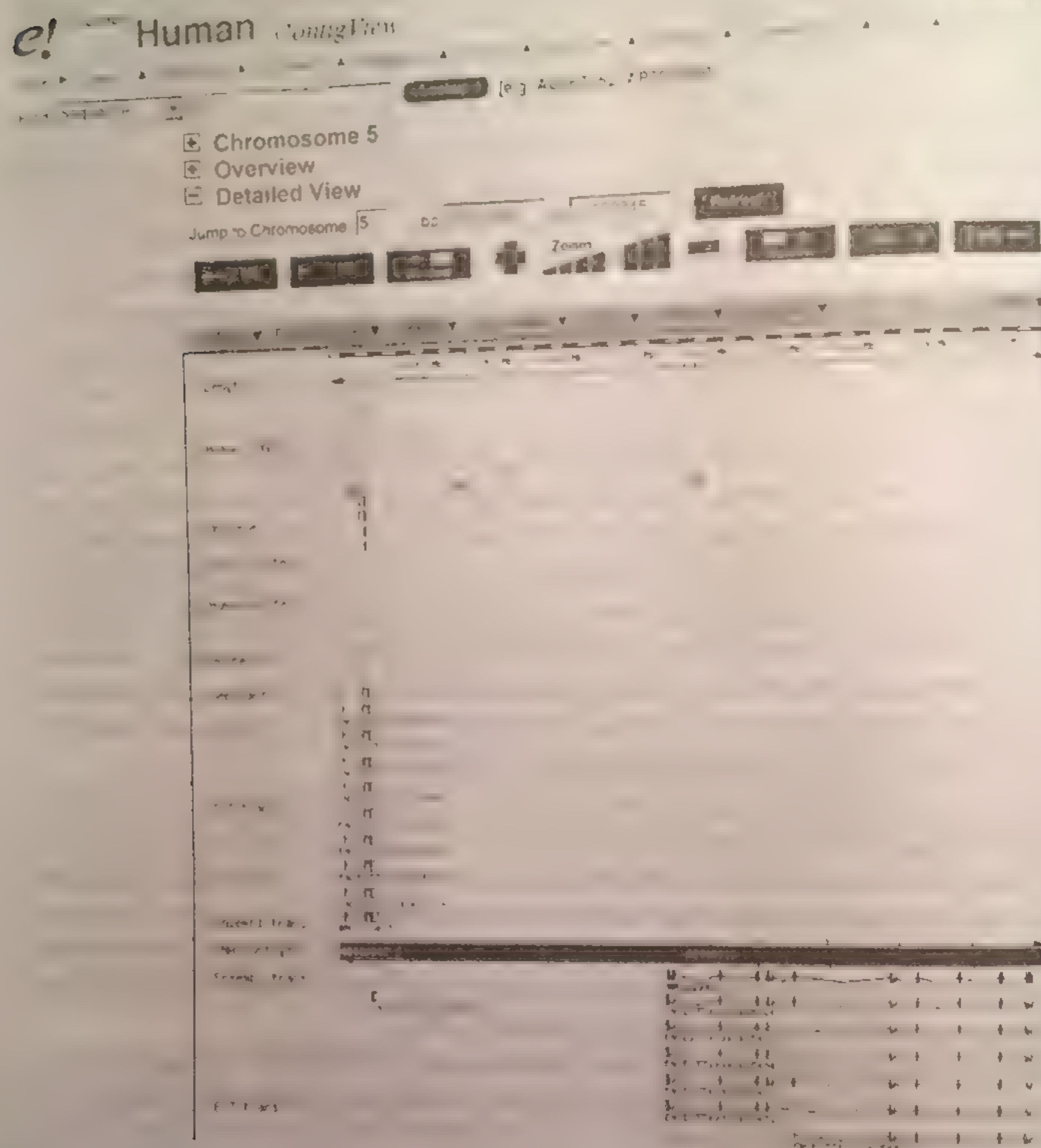


Рис. 2-8 Изображение на экране при просмотре генома человека с помощью программы EnsEMBL, демонстрирующее всю хромосому 5, общий вид района p13.2 и часть подробного описания фрагмента (100 кб) этого района. Пользователь может вывести на экран нижнюю часть изображения и просмотреть последовательность ДНК, а также результаты трансляции обеих цепей в трех рамках считывания.

признаки гена не были узнаны компьютером (это случается с атипичными генами, например, для некодирующих РНК). Человеческие гены бывает трудно распознать, поскольку зачастую они очень большого размера, но состоят из маленьких экзонов, отделенных друг от друга огромными интронами. Поэтому даже если ген удастся идентифицировать, очень часто могут быть пропущены экзоны или неправильно определены границы гена. Существуют примеры, когда малые гены человека были спрятаны внутри интронов генов большего размера. Создание полного и точного каталога человеческих генов может потребовать очень много времени.

Существенная проблема, возникающая на последних стадиях секвенирования, — представление данных по сиквенсу и соответствующих описаний в доступной форме. Проблема была в значительной степени преодолена в результате разработки **геномных браузеров (программ просмотра)**. Последние осуществляют визуализацию получаемых данных и позволяют пользователю перемещаться на экране между изображениями, демонстрирующими геном с различным уровнем разрешения. Например, браузер EnsEMBL (<http://www.ensembl.org/>) позволяет пользователю обозревать весь геном как набор хромосом. Наведя курсор на изображение хромосомы и кликнув, пользователь может выйти на конкретный субхромосомный район и последовательно увеличить разрешение вплоть до моонуклеотидного уровня (рис. 2-8). Каждый хромосомный сегмент подробно описывается с указанием генов, маркеров и других особенностей, которые регулярно обновляются по мере поступления новой информации. Имеется широкая связь с внешними базами данных, которые дают дополнительную информацию о структуре и функции генов, а также о родственных генах в геномах других организмов.

Перспективы: функциональная геномика

Теперь мы знаем, что в человеческом геноме около 30 тыс. генов. Дальнейшая задача, если говорить упрощенно, заключается в том, чтобы выяснить, что все эти гены делают (установление функций этих генов). Известно, что наши наследственные болезни обусловлены повреждениями генов, что гены определяют реакцию нашего организма на лекарства, на инфекцию, вызванную патогенными микроорганизмами, и другие факторы окружающей среды, а также то, что гены влияют на нашу предрасположенность к болезням (таким, как астма), которые во многом зависят от внешних условий. С помощью обычных методов исследования связи «ген—болезнь» или «ген—ответ» были установлены только приблизительно для 1500 генов, и в каждом случае «путь к истине был долог и тернист».

Целью функциональной геномики является установление функции генов в широком масштабе с использованием новых высокопроизводительных технологий. Таким образом, эти технологии являются новым инструментом развития медицины. Глобальная задача — установить точные взаимодействия между генами, а еще точнее, между их белковыми продуктами, которые обеспечивают координацию процессов, происходящих в здоровом организме. В случае нарушения этих процессов важно знать, что происходит на молекулярном уровне, так как это позволит разработать и внедрить в медицинскую практику более эффективные лекарства. То же самое справедливо и в отношении генов и белков патогенных микроорганизмов. Чем больше мы знаем о них и о том, как они взаимодействуют с белками нашего собственного организма, тем больше появляется возможностей для нашего вмешательства и подавления инфекции. В рамках функциональной геномики можно выделить несколько ключевых направлений, принципы и приложения которых обсуждаются ниже.

Сравнение последовательностей. Сравнительная геномика

Существует возможность получать информацию о функции гена без проведения экспериментов. Компьютерные программы, используемые для поиска генов в геномной ДНК, обычно имеют подпрограммы, с помощью которых можно попытаться выявить последовательности, соответствующие известным генам, по принципу поиска сходства. Эти программы используют **базы данных последовательностей**, которые являются универсальными хранилищами генетической информации. Значимость таких баз данных для геномных исследований невозможно переоценить. Базы данных — это электронные хранилища любых видов биологической информации, и многие из них находятся в свободном доступе через Интернет. В **первичных базах данных** хранятся исходные последовательности нуклеиновых кислот и белков, а так называемые **вторичные базы данных** содержат сведения (на основании первичных данных) о белках, объединенных в высококонсервативные семейства (табл. 2-3). Программы поиска, такие как BLAST и FASTA, а также их производные позволяют сравнивать новые последовательности со всеми уже имеющимися в базах данных структурами с целью обнаружения сходства. Очень важно то, что в базах данных содержится информация не только о последовательностях, но и о функции генов. Если функция человеческого гена неизвестна, то часто возникают ситуации, когда изучались родственные гены в других организмах, и имеется некоторая информация об их функции. Поэтому зачастую самый быстрый путь к установлению функции нового гена — поиск в базах данных родственных последовательностей, свойства которых уже описаны.

Функциональное аннотирование путем сравнения последовательностей может быть использовано в масштабе генома, но этого недостаточно для определения функции всех генов. Когда в 1996 г. была определена последовательность генома дрожжей, 30% генов были уже известны и их функции установлены в реальных экспериментах. Возможные функции следующих 30% предполагаемых генов были установлены на основании гомологии с другими уже имеющимися в базах данных генами. Функции еще 30% генов (их называют «**гены-сироты**») неизвестны, а являются ли остальные 10% предполагаемых генов действительно генами, — пока еще вопрос. Функциональное аннотирование человеческого генома осложняется еще большими трудностями в точном предсказании генов, однако функции около 60% генов могут быть включены в описание либо на основании уже имеющихся экспериментальных данных, либо на основании гомологии с уже охарактеризованными человеческими генами или генами других организмов. Функция 40% остальных генов вообще не известна.

Проблема существования генов-сирот отчасти связана с трудностями обнаружения родственных последовательностей. Стандартные алгоритмы поиска могут надежно выявлять последовательности белков, которые идентичны на 30%, но при более низком уровне гомо-

Таблица 2-3

Базы данных

Первичные

GenBank

База данных

последовательностей

Японский банк

ДНК (DDB)

SWISS-PROT

Вторичные базы

последовательностей

ProSite

BLOCKS

PRINTS

Pfam

InterPro

Базы данных

Protein

Europe

Structure

Европейская

структура

логич

могу

руже

тель

бел

ход

ши

Пр

по

и

л

с

Таблица 2-3 Первичные и вторичные базы данных последовательностей и структур

Базы данных	URL (универсальное местоположение ресурса)
Первичные базы данных	
GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html
База данных нуклеотидных последовательностей EMBL	http://www.ebi.ac.uk/embl/
Японский банк данных ДНК (DDBJ)	http://www.ddbj.nig.ac.jp/
SWISS-PROT и TrEMBL	http://us.expasy.org/sprot/
Вторичные базы данных по последовательностям	
ProSite	http://us.expasy.org/prosite
BLOCKS	http://www.blocks.fhcrc.org
PRINTS	http://bioinf.man.ac.uk/dbbrowser/PRINTS
Pfam	http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam
InterPro	http://www.ebi.ac.uk/interpro/
Базы данных структур белков	
Protein Databank (PDB)	http://rscb.org
European Macromolecular Structure Database (EMSD) Европейская база данных структур макромолекул	http://www.ebi.ac.uk/Databases/structure.html

логии установить «родство» гораздо труднее. В некоторых случаях могут помочь более изощренные методы поиска, основанные на обнаружении в структуре «паттернов» и профилей (элементов последовательностей, связанных с функцией), присущих большим семействам белков, но эти методы не всегда надежны. Относительно новый подход подразумевает использование для функциональной аннотации вышедших (пространственных) структур белков, а не последовательностей. Пространственные структуры белков гораздо более консервативны, чем последовательности. Например, структуры гемоглобина и миоглобина имеют существенное сходство, хотя их последовательности идентичны лишь на 17%. С использованием программ сравнения DALI, VAST и COMPARER можно с достаточной степенью надежности установить сходство между белковыми структурами, имеющими лишь 10%-ую идентичность на уровне последовательностей. Существуют первичные базы данных белков (последовательности), структуры которых определены рентгеноструктурным анализом и/или с помощью спектроско-

пии ядерного магнитного резонанса. В настоящее время существует несколько международных проектов, направленных на систематическое и высокопроизводительное (массовое) определение пространственных структур белков, так что примеры белков всех имеющихся различных семейств хранятся в базах данных. В будущем можно будет идентифицировать функции генов-сирот путем экспрессии кодируемых ими белков, определения их структур и сравнения этих структур с теми, что есть в базах данных. Однако если это реализуется, то должен быть принят стандартный язык для описания белковых структур (дополнение 2-7).

Другой подход к функциональному аннотированию (описанию) генома, основанный на анализе последовательностей, называется **сравнительной геномикой**. Принцип сравнительной геномики заключается в поиске сходства между организмами не на уровне отдельных генов, а на уровне целых геномов. Это может быть полезно с нескольких точек зрения.

Дополнение 2-7 Стандартизованная структурная и функциональная классификация белков

Функциональная аннотация генов и их продуктов часто зависит от экспериментов, выполняемых в различных лабораториях мира на разных организмах. Ученые обычно описывают практически одни и те же белки под разными названиями, но не это главное. Гораздо важнее то, что когда мы говорим о доступности все возрастающей по объему информации и о международном сотрудничестве, возникает необходимость стандартизации в описании структур и функций белков, поскольку это относится к «точным» физическим свойствам.

Было разработано несколько различных иерархических систем для классификации белковых структур, включая SCOP (Structural Classification of Proteins — структурная классификация белков), CATH (Class, Architecture, Topology, Homologous superfamily, т. е. класс, архитектура, топология, гомологичное подсемейство) и FSSP (Fold classification from Structure-Structure alignment of Proteins — классификация фолдов на основе сравнения структур белков). Различные системы используют различные критерии и пороговые величины для распознавания **групп (типов) укладки (fold groups)** (фолд, или тип укладки — другой путь описания третичной, структуры белка). Другими словами, в то время как на высших

уровнях иерархии наблюдается сходство между белками, на более низших уровнях классификации обнаруживаются различия. Дополнительные проблемы возникают из-за суперфолдов (структуры, представленные лишь в нескольких белковых семействах, обнаруживающих очень отдаленное родство) и существования промежуточных (непрерывных) вариантов между одним типом укладки и другим.

Систематическая функциональная классификация белков осуществляется под эгидой Консорциума генных онтологий, который разрабатывает общую систему классификации, применимую ко всем организмам (<http://www.geneontology.org/>). Эта система основана на трех независимых принципах классификации белков, учитывающих биохимическую функцию (например, киназа), роль в клетке (например, определенный сигнальный путь) и участие в биологическом процессе (в случае человеческого организма это подразумевает роль белка в развитии болезни). Система, разработанная Консорциумом генных онтологий, не ограничена иерархической классификацией и, следовательно, она более гибкая, чем любая из используемых в настоящее время систем структурной классификации.

В случае близкородственных организмов (например, мышь и человек) сравнительная геномика может облегчить идентификацию генов и их регуляторных элементов, поскольку в обоих геномах будут найдены только последовательности с эволюционно сохранившимися функциями, в то время как другие последовательности должны существенно различаться. Существует также удивительная степень консервативности на уровне метаболических путей и связей даже между далеко отстоящими друг от друга организмами. Один поразительный пример — сохранение сигнального пути инсулина у человека и нематоды *Caenorhabditis elegans*. Действительно, около 60% известных генов, ответственных за болезни человека, имеют аналоги в геноме этого червя и/или других беспозвоночных модельных организмов (например, плодовой мушки *Drosophila melanogaster*). Есть возможность проводить эксперименты на этих удобных для работы организмах с целью идентификации других компонентов метаболических путей, что может способствовать выявлению соответствующих человеческих генов. Для 30% генов, связанных с болезнями человека, существуют «родственники» даже в дрожжах; эти гены отвечают за такие высококонсервативные функции, как клеточное деление и репарация ДНК. Помимо того что эти организмы являются средством установления функций генов, они также могут быть использованы для моделирования болезней (см. гл. 8). Например, с целью создания превосходной модели диабета 2-го типа можно нарушить сигнальный путь инсулина в *C.elegans*.

Сравнение последовательностей и/или структур генов может быть первым важным этапом предсказания их функции, однако имеется несколько причин, почему эта информация должна интерпретироваться с осторожностью.

- Участки пониженной сложности найдены во многих белках с чрезвычайно разнообразными функциями. В эту категорию попадают трансмембранные домены.

- Сходство последовательностей не гарантирует функциональное сходство. Некоторые последовательности многофункциональны и могут неожиданно обнаруживаться в белках с совершенно неродственными функциями. Например, α/β -гидролазная складка образует часть каталитического центра функционально разных ферментов и также найдена в молекуле белка клеточной адгезии.

- Некоторые белки приобрели дополнительные функции в процессе эволюции. Хороший пример — пополнение разнообразия достаточно простых метаболических ферментов, кристаллинов, белков, которые обеспечивают преломление света хрусталиками наших глаз.

- Из-за того что исследователи пользуются неодинаковой терминологией при описании функций, могут возникать неясности. Недавно была достигнута договоренность о стандартизации номенклатуры для функциональной классификации (дополнение 2-7).

- Базы данных содержат ошибки, часть из которых «канцелярские», но многие возникают в процессе эксперимента. Аннотирование ново-

го гена только лишь на основании информации в базах данных приводит к риску принятия в качестве достоверных ошибочные результаты (внесенные в базы данных на основе других исследований). Наконец, большинство функциональных предсказаний, основанных на сходстве последовательностей, относится к биохимическим функциям, а это не всегда приносит пользу. Например, можно установить, что новый ген кодирует протеинкиназу, но это не дает никакой информации о другой возможной роли белка. Необходима дополнительная информация о функциях белка на биологическом и клеточном уровнях, включая его роль в возникновении болезни, а это может быть установлено с помощью экспериментов другого типа.

Транскриптомика. Глобальный анализ мРНК

Некоторые особенности функционирования гена могут быть установлены в результате анализа экспрессионных профилей. Например, если ген экспрессируется в ответ на сигнал фактора роста, можно с большой долей уверенности утверждать, что функция гена связана в какой-то степени с клеточной пролиферацией. Гены, которые экспрессируются в патологических (нездоровых) тканях, но не экспрессируются в здоровых, и наоборот, по-видимому, участвуют в развитии болезни или в реакции организма на болезнь. Аналогичным образом, специфически экспрессирующиеся в ответ на лекарственную терапию гены могут быть ответственны за неблагоприятную реакцию на лекарства. Обычно профили экспрессии исследовали для отдельных генов или небольших групп, что сводило весь объем исследований к анализу генов-кандидатов, роль которых в развитии болезни уже предполагалась. Однако с 1995 г. стали нарастать тенденции к проведению **глобального анализа генной экспрессии**, при котором одновременно изучались экспрессионные профили для тысяч генов. В конце концов, когда-нибудь появится возможность анализировать весь транскриптом, т. е. весь набор мРНК в клетке. Этот тип всеобъемлющего анализа даст возможность идентифицировать все гены, участвующие в любом важном с медицинской точки зрения процессе. Уже сейчас анализ транскриптома позволил идентифицировать новые маркеры болезней, лекарственные мишени, продукты генов, обладающие потенциальным терапевтическим действием, а также получить данные, позволяющие объединить гены в функциональные группы. Широкие перспективы в этом направлении открывают два технологических подхода: сиквенсный сэмплинг (отбор проб для сиквенса) и использование микрочипов.

Скрининг проб для сиквенса

Глобальное профилирование экспрессии генов методом **отбора проб для сиквенса** основано на простом принципе: сильно экспрессирующиеся гены дают большие количества мРНК, чем слабо экспрес-

сирующиеся и, следовательно, будут лучше представлены в библиотеках кДНК. В таком случае секвенирование тысяч случайно взятых клонов кДНК с последующим подсчетом числа всех представленных в выборке генов дает грубую оценку относительных уровней экспрессии генов. Более того, сравнение двух библиотек кДНК (например, полученных из здоровой ткани и клинического образца, в частности, раковой опухоли) может выявить различным образом экспрессирующиеся гены, и, таким образом, идентифицировать те, что изменены в случае болезни.

Метод сиквенсного сэмплинга достаточно надежен, но он трудоемок и дорогостоящ, поскольку требует крупномасштабных экспериментов. Для преодоления такого рода трудностей были разработаны варианты высокопроизводительного сиквенсного сэмплинга, и один из них, получивший наибольшее признание, — **серийный анализ экспрессии генов (SAGE, от англ. serial analysis of gene expression)**. Принцип метода SAGE показан на рис. 2-9: простая схема скрывает сложные детали. Вместо индивидуального отбора тысяч кДНК с помощью ферментов рестрикции из каждой кДНК извлекают короткие концевые фрагменты (маркеры, tags) (8–15 нуклеотидов), и эти фрагменты соединяют (лигируют) в протяженные конкатемеры. Конкатемеры секвенируют, и поскольку каждый из них содержит фрагменты, соответствующие 50–100 молекулам кДНК, то объем данных, полученных в рамках одного эксперимента, существенно возрастает. Подсчет числа одинаковых фрагментов (соответствующих различным кДНК) позволяет оценить относительный уровень экспрессии генов. Существуют базы данных SAGE, что позволяет сравнивать результаты отдельных экспериментов.

Микрочипы

ДНК-микрочипы — миниатюрные устройства, содержащие множество различных последовательностей ДНК или характерных элементов, каждый из которых соответствует различным генам. Два основных типа микрочипов: **точечный микрочип**, получаемый нанесением фрагментов ДНК на покрытое гелем предметное стекло микроскопа, и **олигонуклеотидный микрочип высокой плотности**, который производят путем прямого синтеза олигонуклеотидов на стеклянной подложке (дополнение 2-8). Несмотря на совершенно разные пути создания каждого из указанных приспособлений, принципы их использования для глобального анализа генной экспрессии практически идентичны. В обоих случаях получение экспрессионных профилей основано на **мультиплексной гибридизации** с использованием сложных смесей меченых молекул ДНК или РНК в качестве гибридизационных зондов.

Типичный эксперимент с применением точечных микрочипов показан на рис. 2-10. С целью создания сложного зонда на основе мРНК из конкретного источника (например, из печени здорового человека)

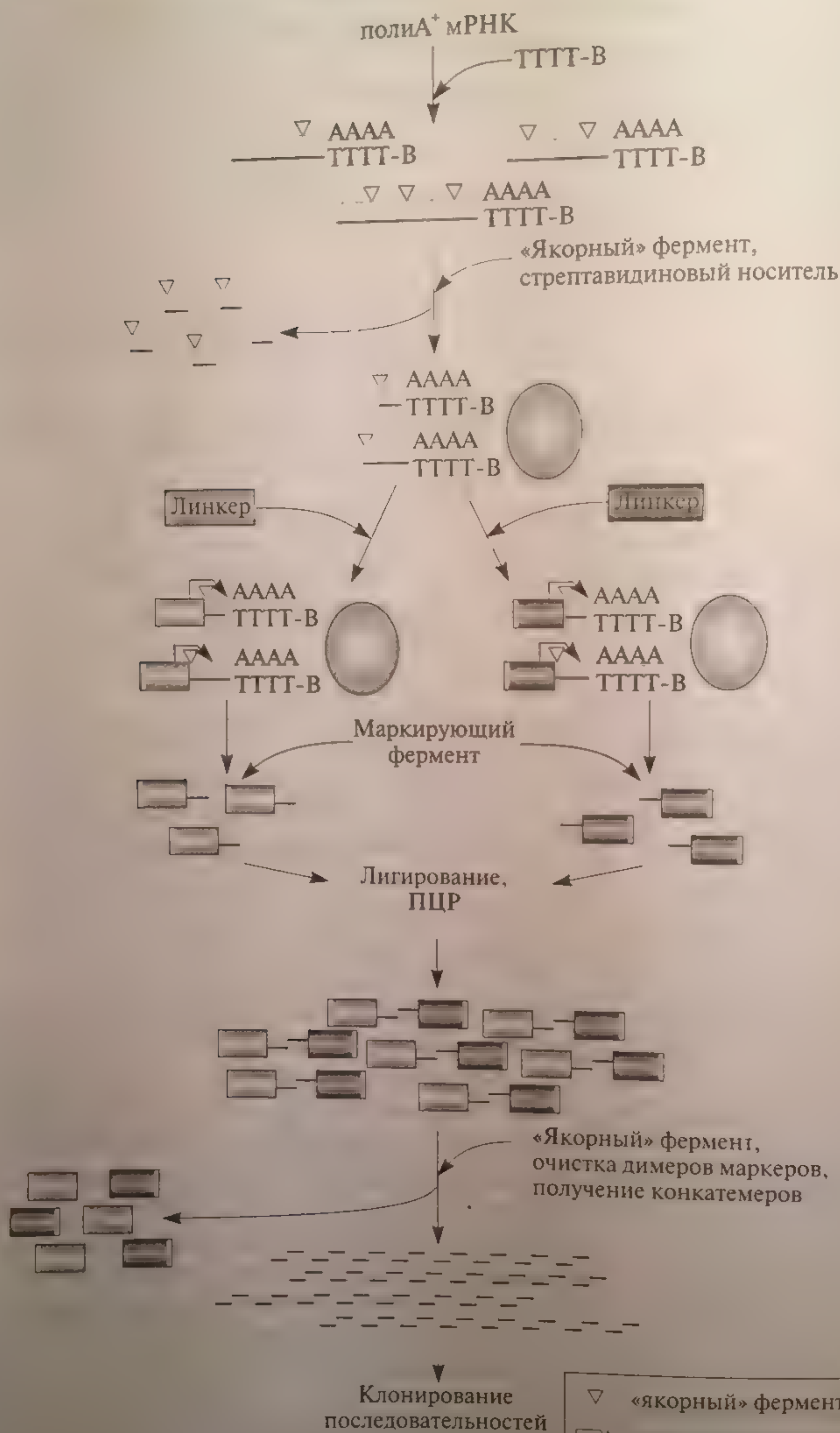


Рис. 2-9 Серии
праймеры, от
ДНК образ
тэрий расше
собным связ
тельностью
особого фер
тает ДНК на
рирует очен
шими одно
ПЦР-ампл
отделены с
ные конка
идентифи
лить уров

Перв
перен
тов ДН
больш
пользо
ными
ного
доть
щес
па
стек
ней
рес
фл
ра
де
до
О
с
я

Рис. 2-9 Серийный анализ экспрессии генов (SAGE). С помощью обратной транскриптазы и праймера олиго-dT, содержащего биотин, получают кДНК-копию полиА⁺мРНК. Затем кДНК обрабатывают «частощепящим» ферментом рестрикции («якорным» ферментом), который расщепляет кДНК, генерируя короткие фрагменты с присоединенным биотином, способным связываться с иммобилизованным на носителе стрептавидином. К этим последовательностям (после иммобилизации) присоединяют линкеры, содержащие сайт узнавания особого фермента рестрикции (tagging-фермент, маркирующий фермент), который расщепляет ДНК на некотором расстоянии от сайта узнавания. Расщепление этим ферментом генерирует очень короткие, прикрепленные к линкерам фрагменты кДНК (маркеры) с выступающими одноцепочечными концами. Достройка «липких» концов до «тупых», лигирование и ПЦР-амплификация приводят к получению димеров маркеров кДНК, которые могут быть отделены от линкеров путем обработки «якорными» ферментами и соединены в протяженные конкатемеры для последующего клонирования. Каждый маркерный фрагмент позволяет идентифицировать ген, а частота встречаемости каждого маркера дает возможность определить уровень экспрессии генов.

Дополнение 2-9 Принципы технологии производства микрочипов

Первые ДНК-чипы были получены путем переноса вручную клонированных фрагментов ДНК на нейлоновые фильтры. Они были большими, неудобными для работы, и использовались в комбинации с радиоактивными зондами. Для размещения достаточного количества проб, позволяющего проводить анализ всего генома, требовалось существенное уменьшение размеров микрочипа. Это было достигнуто при использовании стекла в качестве подложки. В отличие от нейлона стекло обладает низкой аутофлуоресценцией, и поэтому можно использовать флуоресцентные зонды, дающие высокое разрешение. Благодаря этому ячейки, содержащие ДНК, можно расположить гораздо ближе друг к другу (на расстоянии 0,3–0,5 мм), что позволяет производить стандартные микрочипы с плотностью 5000 ячеек/см². Первые промышленные кДНК-чипы были чрезвычайно дорогими и доступными лишь хорошо финансируемым лабораториям. Однако в последние годы из-за конкуренции между производителями, а также благодаря появлению во многих университетах и институтах собственных малых производств цены упали.

Олигонуклеотидные чипы можно получать по аналогии с кДНК-чипами, т. е. путем нанесения олигонуклеотидных проб в определенные положения стеклянной подложки с помощью прецизионных роботизированных систем. Однако гораздо боль-

шая плотность может быть достигнута путем синтеза олигонуклеотидов *in situ* с использованием литографического процесса, разработанного компанией Affimetrix (США). Коммерчески доступные микрочипы этой фирмы (GeneChips) имеют плотность 64000 ячеек/см², а в экспериментальных вариантах были достигнуты даже более высокие плотности (250 000–1 000 000 ячеек/см²). Первая стадия производственного процесса включает нанесение покрытия на стеклянную подложку, чтобы ДНК можно было ковалентно присоединить к поверхности. Олигонуклеотиды затем синтезируются в определенных позициях путем последовательного добавления определенных дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP). Каждый dNTP модифицирован и содержит фотолabile защитную группу, так что молекула ДНК не может быть удлинена, если не активирована светом. Фотолитографические маски, используемые для получения чипа, указывают те районы, где ДНК может быть удлинена, и где она остается инертной. Таким путем в заранее заданных местах синтезируются специфические последовательности. Поскольку технология запатентована Affimetrix, то сами чипы, оборудование, а также необходимое программное обеспечение чрезвычайно дороги. Часто гораздо дешевле заключить контракт на проведение экспериментов

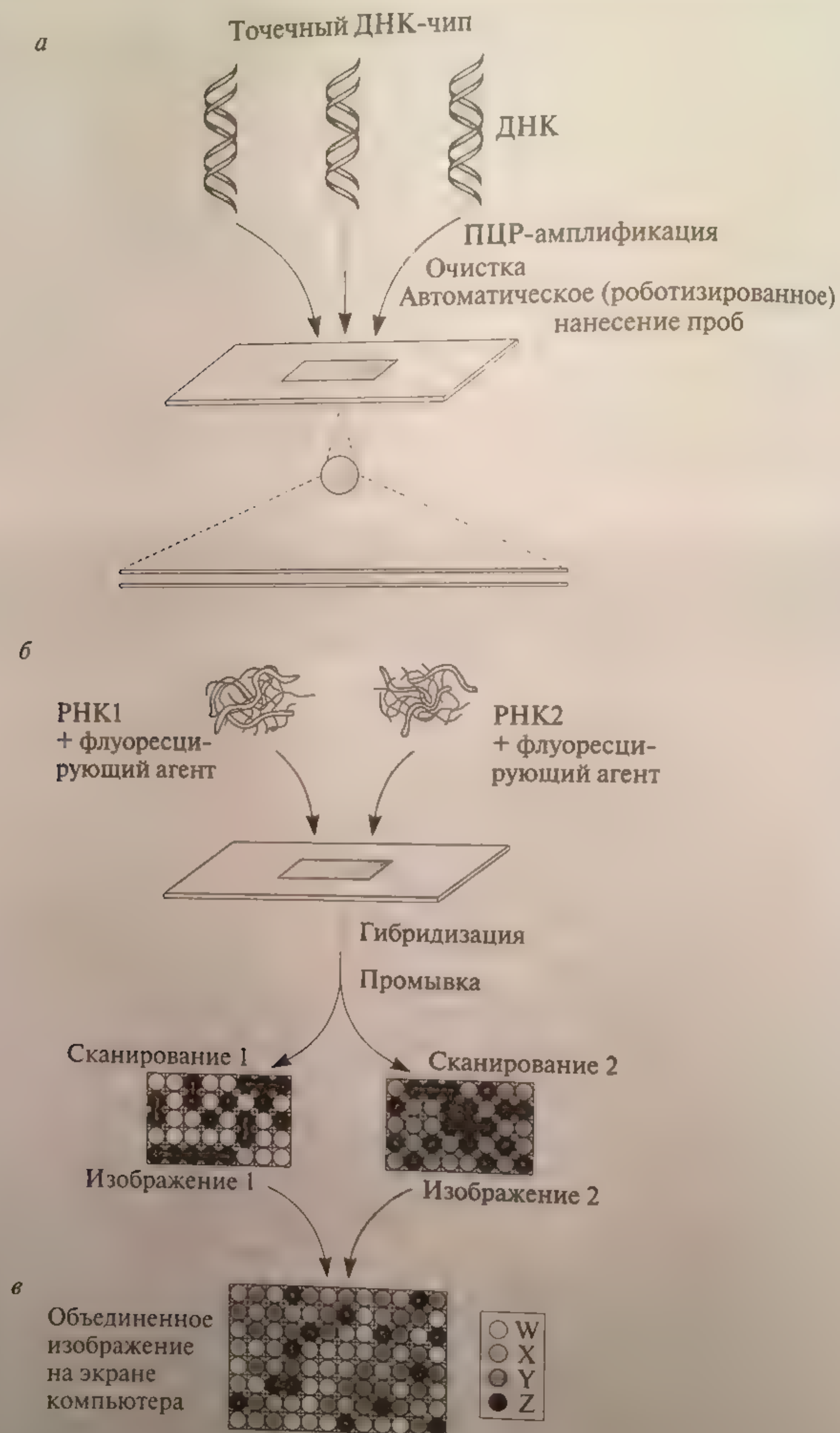


Рис. 2-10 Точечные ДНК-чипы. *а* — принцип производства (см. подробности в дополнении 2-8); *б* — сравнительный анализ уровней генной экспрессии; *в* — объединенное изображение, демонстрирующее четыре типа сигналов: W — гены, экспрессирующиеся одинаково в каждом образце мРНК; X — гены, экспрессирующиеся сильнее в образце 1; Y — гены, экспрессирующиеся сильнее в образце 2; Z — гены, не экспрессирующиеся ни в одном из образцов.

получают кДНК с использованием реакционной смеси, содержащей флуоресцентные аналоги нуклеозидтрифосфатов. Таким образом, популяция кДНК оказывается **полностью меченной**, т. е. каждая молекула кДНК содержит флуоресцентные нуклеотиды. Эта сложная смесь молекул кДНК соответствует исходной популяции мРНК — в ней много кДНК-копий транскриптов, широко представленных в популяции, и мало копий редко встречающихся транскриптов. Такая смесь зондов используется для гибридизации с микрочипом, и индивидуальные молекулы комплементарно взаимодействуют со своими мишенями. На точечных микрочипах каждый образец или «точка» содержит 10^6 – 10^7 копий одной и той же последовательности ДНК. Это намного превышает число копий любой специфической кДНК в составе сложного зонда, даже если кДНК соответствует транскрипту, представленному в смеси в избытке. В таких условиях происходит **ненасыщающая гибридизация** и интенсивность гибридизационного сигнала в каждой ячейке (точке) микрочипа пропорциональна относительному содержанию специфической кДНК в составе зонда. Таким образом, в одном эксперименте можно сравнивать относительные уровни экспрессии тысяч различных транскриптов.

Сравнение различных образцов (например, из здоровой печени и гепатомы) позволяет идентифицировать по-разному экспрессирующиеся гены. Такое сравнение может быть осуществлено в результате гибридизации одинаковых копий микрочипов со сложными зондами, полученными из разных образцов. Однако гораздо большая наглядность может быть достигнута путем мечення двух популяций кДНК различными флуорофорами и проведения гибридизации с одним и тем же микрочипом. Соотношение сигналов, полученных от каждого из флуорофоров, позволяет сравнивать уровни экспрессии (одних и тех же генов) в двух образцах. Обычно микрочип сканируют при двух длинах волн эмиссии флуоресценции, затем с помощью компьютера результаты накладываются друг на друга и выводятся на экран в виде изображения микрочипа с окрашенными в разные цвета ячейками. Если одному флуорофору поставлен в соответствие зеленый цвет, а другому — красный, то ячейки, соответствующие различным образом экспрессирующимся генам, будут окрашены либо в зеленый, либо в красный цвет. Ячейки, соответствующие генам, экспрессирующимся на одном и том же уровне в обоих образцах, будут желтыми (рис. 2-11).

Применение транскриптомики

Методы скрининга проб для сиквенса и SAGE были использованы для характеристики профилей экспрессии генов, связанных с рядом болезней, включая атеросклероз, ВИЧ-инфекцию и рак. Точечные микрочипы и чипы марки GeneChips были также широко использованы для профилирования генной экспрессии в случае таких болезней, как астма, ревматоидный артрит, атеросклероз, диабет, энтерит, рак и



Рис. 2-11 Монохроматическое изображение первичных результатов эксперимента по гибридизации микрочипа. Интенсивности сигналов в различных позициях чипа отражают различные количества мРНК в образце клеток, находящихся в стационарной фазе роста. Для сравнения уровней мРНК, характерных для двух различных типов (наборов) условий, используются два флуорофора с различными длинами волн возбуждения и эмиссии. Результаты таких экспериментов могут быть представлены в виде окрашенных, как это приведено на задней стороне обложки книги.

цитомегаловирусная инфекция. Как было показано во всех этих исследованиях, уровни экспрессии большого числа генов подвергаются изменениям, что свидетельствует о том, что болезни и изменения окружающей среды вызывают изменения в транскриптоме. В некоторых случаях такие эксперименты помогают идентифицировать новые маркеры болезней. Например, ген *CD36* был идентифицирован в качестве нового маркера синдрома резистентности к инсулину. Другие исследования позволили выявить потенциальные мишени для лекарств. Например, было показано, что экспрессия гена *EGF1* увеличивается в 5 раз при атеросклерозе — болезни, при которой обогащенные холестерином клетки откладываются на внутренней стенке артерий. Продукт гена *EGR1* представляет собой фактор транскрипции множества известных генов, часть из которых кодируют белки, участвующие в коагуляции крови и клеточной адгезии, что, видимо, и определяет роль этого гена в развитии заболевания. Подобного рода исследования позволили по-новому взглянуть и на другие биологические процессы. Например, добавление сыворотки крови к культуре неделящихся (покоящихся) фибробластов приводило к ожидаемой индукции генов пролиферации, а также генов, участвующих в заживлении ран (таких,

как *VEGF*), которые способствуют росту новых кровяных сосудов. Будучи исследовательским инструментом, транскриптомика предоставляет также большие возможности и для диагностики. Различия в профилях экспрессии генов могут помочь различать болезни, которые обычными методами различить трудно. В качестве примера на с. 152 обсуждаются два родственных заболевания: острая миелоидная лейкемия и лимфобластоидная лейкемия.

Протеомика. Глобальный анализ белков

Без сомнения, анализ транскриптома — важный подход к исследованию и характеристике заболеваний и реакций человеческого организма на лекарства или на изменения окружающей среды. Однако в большинстве случаев действительно функциональными молекулами в клетке являются не мРНК, а белки. Относительное содержание определенного транскрипта не всегда отражает количество соответствующего белка, поскольку синтез белка часто регулируется независимо. Более того, активность белка часто зависит от посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование, и это невозможно предсказать на основании данных о количестве мРНК. Поэтому, чтобы получить правильную картину функционирования здоровой и больной клетки, необходимо исследовать непосредственно белки. Полный набор белков в данной клетке называется **протеомом**, а **протеомика** — это исследования белков в глобальном масштабе.

И транскриптомика, и протеомика связаны с мониторингом генной экспрессии, однако протеомика охватывает еще несколько дополнительных областей исследования. Эквивалент транскриптомики при исследовании белков иногда называют **экспрессионной протеомикой**; она включает широкомасштабные подходы к исследованию и сравнению соотношения белков в различных образцах. Многие задачи экспрессионной протеомики аналогичны задачам транскриптомики — идентификация маркеров, лекарственных мишеней, потенциально терапевтических белков и использование экспрессионных профилей для диагностики. Однако в случае экспрессионной протеомики имеется важное преимущество: изменения в соотношении белков непосредственно отражают изменение биохимической активности клетки. Кроме того, протеомные методы позволяют различать модифицированные и немодифицированные белки, например фосфорилированные и нефосфорилированные аналоги. В частности, белок статин — важный маркер детской лейкемии, но при этом только его фосфорилированная форма свидетельствует о наличии заболевания (см. с. 153).

Другие направления протеомики связаны с взаимодействиями белков и их структурой. **Протеомика взаимодействий** охватывает все высокопроизводительные методы изучения белок-белковых взаимодействий и взаимодействий белков с другими молекулами. Исследования белок-белковых взаимодействий помогают установить участие белка в

белковых комплексах или в метаболических путях, и это очень важно для накопления фундаментальных знаний, включая возможный вклад науки в разработку лекарственных препаратов. Например, если идентифицирован поверхностный рецептор клетки, сверхактивность которого ответственна за определенную болезнь, то потенциально он может рассматриваться как хорошая мишень для лекарств. Однако если у гена, кодирующего этот рецептор, существует множество полиморфных вариантов в популяции, то тогда трудно выявить лидирующее соединение (наиболее эффективный лекарственный препарат), пригодное для взаимодействия со всеми белками. Фармацевтические компании могут попытаться выявить целый ряд препаратов, позволяющих с высокой эффективностью лечить определенные подгруппы пациентов. Однако предпочтительнее было бы идентифицировать белки, взаимодействующие с рецептором, с целью выявления (среди них) суррогатных мишеней, демонстрирующих более низкий уровень полиморфизма. Лекарства, взаимодействующие со второй мишенью, достигают той же цели: вызывают нарушение сигнального пути.

Исследования белковых взаимодействий с малыми молекулами позволяют выбрать подходящие лидирующие соединения на рациональной основе, а не на основании случайного скрининга библиотек химических веществ (см. гл. 7). В таких исследованиях можно использовать молекулы, аналогичные известным лигандам, или выбранные на основе компьютерного моделирования их взаимодействий с белком-мишенью. Этот подход, известный как **рациональный дизайн лекарств**, оказался эффективен при разработке лекарств, таких как каптоприл и занамивир (реленца). Для моделирования взаимодействий необходимо располагать данными о пространственной структуре белков — мишеней лекарств. Как уже обсуждалось выше, в рамках **структурной протеомики** были начаты работы по установлению пространственных структур, типичных (характерных) для различных семейств белков. Однако существуют также проекты медицинской направленности, цель которых устанавливать пространственные структуры белков, участвующих в развитии болезней.

Биотехнологические основы разделения протеомов

Протеом типичной человеческой клетки чрезвычайно сложен и содержит до 100 тыс. различных белков, количественное содержание которых может различаться на 4–5 порядков. В отличие от нуклеиновых кислот белки невозможно амплифицировать с помощью простых методов, таких как ПЦР, поскольку химическая и физическая структуры белков чрезвычайно разнообразны. Кроме того, для белков не существует процедур, эквивалентных гибридизации, которые можно было бы использовать для одновременного анализа всех белков. Поэтому в то время как белковые чипы были разработаны для анализа экспрессии (дополнение 2-9), основные методы экспрессионной протеомики

Дополнение 2-9 Белковые чипы

Белковые микрочипы — это миниатюрные приспособления, в принципе аналогичные ДНК-микрочипам и используемые для анализа белков. Они и производятся практически так же — путем автоматического точечного нанесения белковых образцов на обработанные стеклянные подложки. Существует два основных типа чипов: **аналитические чипы** и **функциональные чипы**. Функциональные чипы используются для исследования биохимической активности и взаимодействия белков, при этом сами исследуемые белки иммобилизованы на чипе. Аналитические чипы, напротив, используются для мониторинга экспрессии, и исследуемые белки находятся в образце, которым обрабатывают чип. Чип сам по себе содержит специфические **улавливающие агенты**, которые могут представлять собой белки (например, антитела, лектины) или молекулы другого типа (например, олигонуклеотидные аптамеры). Использование лектиновых чипов для исследования гликопротеинов более детально обсуждается на дополнении 6-5. Существуют также другие типы аналитических устройств, называемых **белковыми биочипами**. Они не улавливают специфические белки, а содержат на поверхности различные хими-

ческие вещества, которые связывают определенные классы белков.

Белковые микрочипы имеют те же преимущества, что и ДНК-чипы, т. е. они позволяют одновременно проводить параллельный анализ множества белков в микромасштабе и в автоматизированном варианте. Их можно легко объединить с последующим масс-спектрометрическим анализом, и они пригодны для использования новых методов детекции, таких как **спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса**, а это значит, что нет необходимости вводить в белок метку. Возможный недостаток заключается в том, что белки химически чрезвычайно разнообразны, и трудно подобрать универсальный набор условий при использовании чипов, которые бы подходили для всех белков. Тем не менее недавно был создан функциональный чип, несущий большую часть всех (около 6000) дрожжевых белков, что должно существенно продвинуть анализ дрожжевого протеома. Протеом человека на порядок сложнее, чем дрожжевой протеом из-за альтернативного сплайсинга и посттрансляционной модификации, так что маловероятно, что чип с человеческим протеомом появится в ближайшем будущем.

базируются на разделении сложных смесей и идентификации белков в индивидуальных фракциях масс-спектрометрией. В настоящее время наиболее популярный метод разделения — **двумерный электрофорез (2DGE)**.

Поскольку протеом очень сложен, то процесс, основанный только на одном свойстве (например, размер, величина заряда, растворимость), не способен обеспечить необходимое разрешение. Преимущества двумерного электрофореза заключаются в том, что белки разделяются в одном направлении по заряду, а в другом направлении по массе (рис. 2-12). Разделение по заряду достигается **изоэлектрической фокусировкой**, при которой денатурированные белки разделяются на полоске геля, имеющего **градиент pH**. Под действием электрического поля белки мигрируют в те области геля, где значения pH соответствуют общему заряду белковых молекул. Электрофорез ведут в течение долгого времени, так что белки фокусируются в участках, соответствующих **изоэлектрическим точкам**, независимо от размера белков. Полоска геля

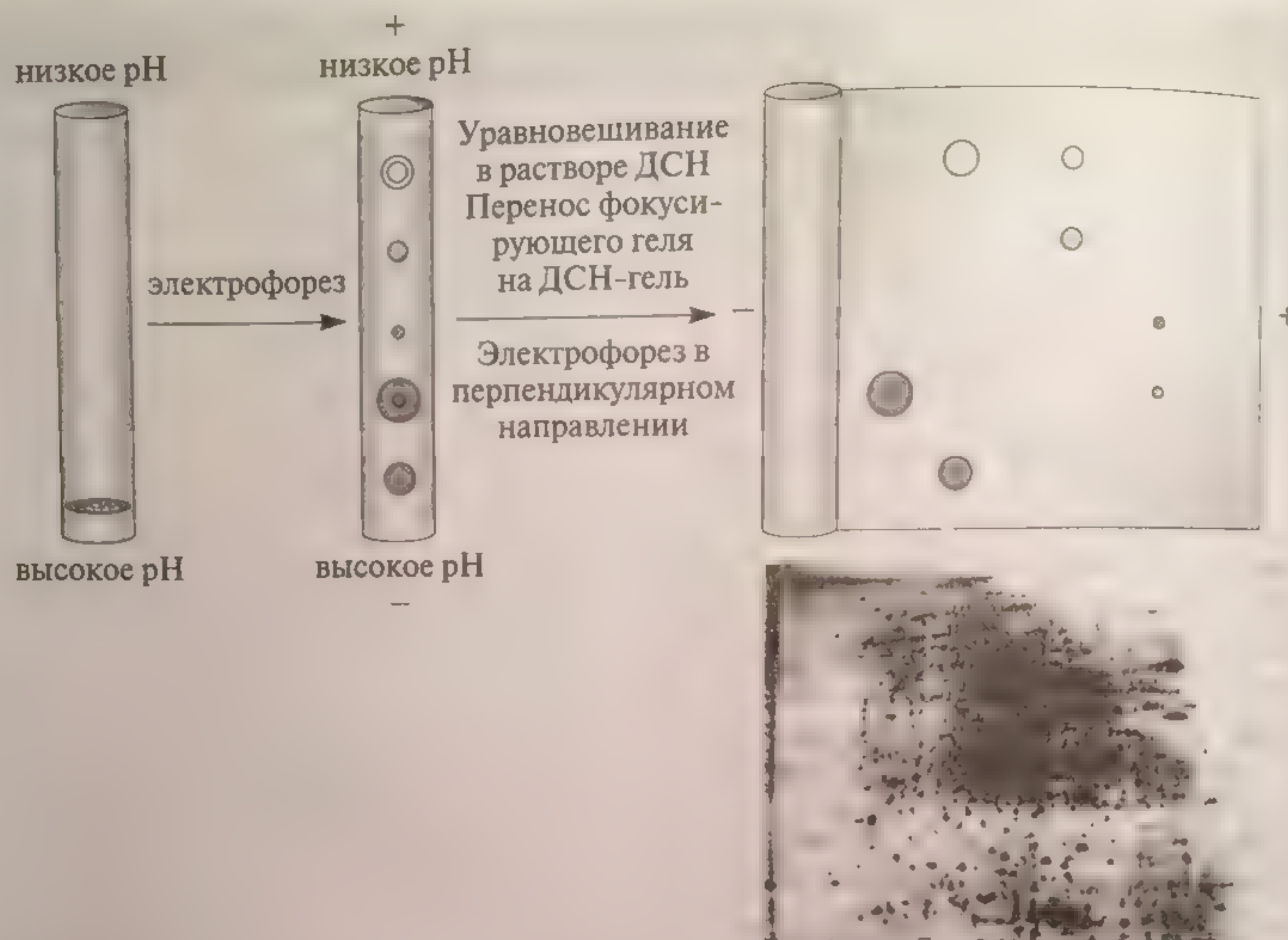


Рис. 2-12 Принцип двумерного электрофореза. Образец денатурированных белков наносится на один конец пластинки с нанесенным гелем. В процессе изоэлектрической фокусировки (ИЭФ) происходит разделение белков в соответствии с их суммарным зарядом **независимо от их молекулярных масс**. Затем ИЭФ-гель уравнивают в растворе ДСН и прикладывают к стандартному гелю ДСН-ПААГ; после проведения электрофореза в перпендикулярном направлении происходит разделение белков по молекулярной массе **независимо от заряда**. Заряд белков показан цветом различной интенсивности от красного (темного на рисунке) (основные белки) до желтого (светлого на рисунке) (кислые белки), а масса обозначена размером кружков. На фотографии — типичный вид белковых пятен на двумерном геле после его прокрашивания.

затем уравнивается у растворе детергента додецилсульфата натрия (ДСН, или *англ.* SDS), который имеет большой отрицательный заряд и связывается с остовом денатурированных белков стехиометрически, эффективно нейтрализуя заряд любой белковой молекулы. Полоску геля помещают на один край пластинки с гелем, и проводят электрофорез таким образом, что электрическое поле направлено перпендикулярно полоске. Разделение по размеру достигается с помощью стандартного ДСН-ПААГ (или *англ.* SDS-PAGE), в котором белки движутся к аноду по порам геля, при этом белковые молекулы меньшего размера движутся сквозь поры быстрее, чем большие белки. Затем гель обычно прокрашивается, и белки обнаруживаются в виде набора пятен (см. вставку на рис. 2-12).

Из-за некоторых ограничений метода двумерного электрофореза (в частности, низкая чувствительность в отношении белков, содержащихся в смеси в очень малых количествах, низкая репрезентативность

определенных классов белков, включая мембранные белки) все большую популярность в качестве альтернативного метода разделения приобретает **многомерная хроматография**. Методы, основанные на распределении смеси белков между твердой неподвижной фазой и жидкой подвижной фазой, называются **хроматографическими**. Неподвижная фаза (или матрикс, носитель) обычно находится в колонке, а подвижная фаза протекает через нее. В протеомике наиболее применяемый метод — **высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)**, при которой жидкая фаза проходит через колонку под высоким давлением. Одно из главных преимуществ ВЭЖХ, помимо скорости и чувствительности, — это возможность ее автоматизации и объединения с последующим масс-спектрометрическим анализом.

Характеристика белков с помощью масс-спектрометрии

Белковые пятна на двумерном геле или фракции, элюируемые с ВЭЖХ-колонок, содержат **неизвестные («безымянные»)** белки. До недавнего времени для их идентификации использовали либо агент, специфически связывающийся с белком (как правило, антитело), либо секвенирование белка ступенчатой деградацией по Эдману. Ни один из этих методов не подходит для анализа целого протеома, когда необходимо быстро охарактеризовать тысячи белков. В начале 1990-х годов выяснилось, что быстрая идентификация белков может быть достигнута масс-спектрометрически. Масс-спектрометрия (МС) используется для определения молекулярных масс, но очень долгое время этот метод не удавалось использовать для анализа больших молекул, включая белки, поскольку процесс ионизации приводит к фрагментации молекулы. В результате разработки методов мягкой ионизации, таких как матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ, или *англ.* MALDI, т. е. лазерная десорбция при содействии матрицы) и электроспрей-ионизация (ЭСИ, или *англ.* ESI), появилась возможность определять массы больших молекул (рис. 2-13). В 1993 г. несколько независимых исследовательских групп опубликовали алгоритмы, которые могут быть использованы для поиска в базах данных белковых последовательностей, соответствующих результатам масс-спектрометрического анализа пептидов. Принципы этого метода, известного как **фингерпринтинг масс пептидов**, состоят в следующем:

- образец белка, например из двумерного геля, расщепляют протеазой трипсином для получения набора — **триптических пептидов**;
- их анализируют методом MALDI-MS (МАЛДИ-МС), как правило, с времяпролетным детектором (TOF, *time of flight*);
- определяют молекулярные массы пептидов;
- поисковый алгоритм, такой как MS-BLAST, использует полученные молекулярные массы пептидов для поиска в базах данных белков. Алгоритм осуществляет **виртуальный гидролиз трипсином** всех белков в базе данных и вычисляет массы соответствующих (из баз данных, т. е. предска-

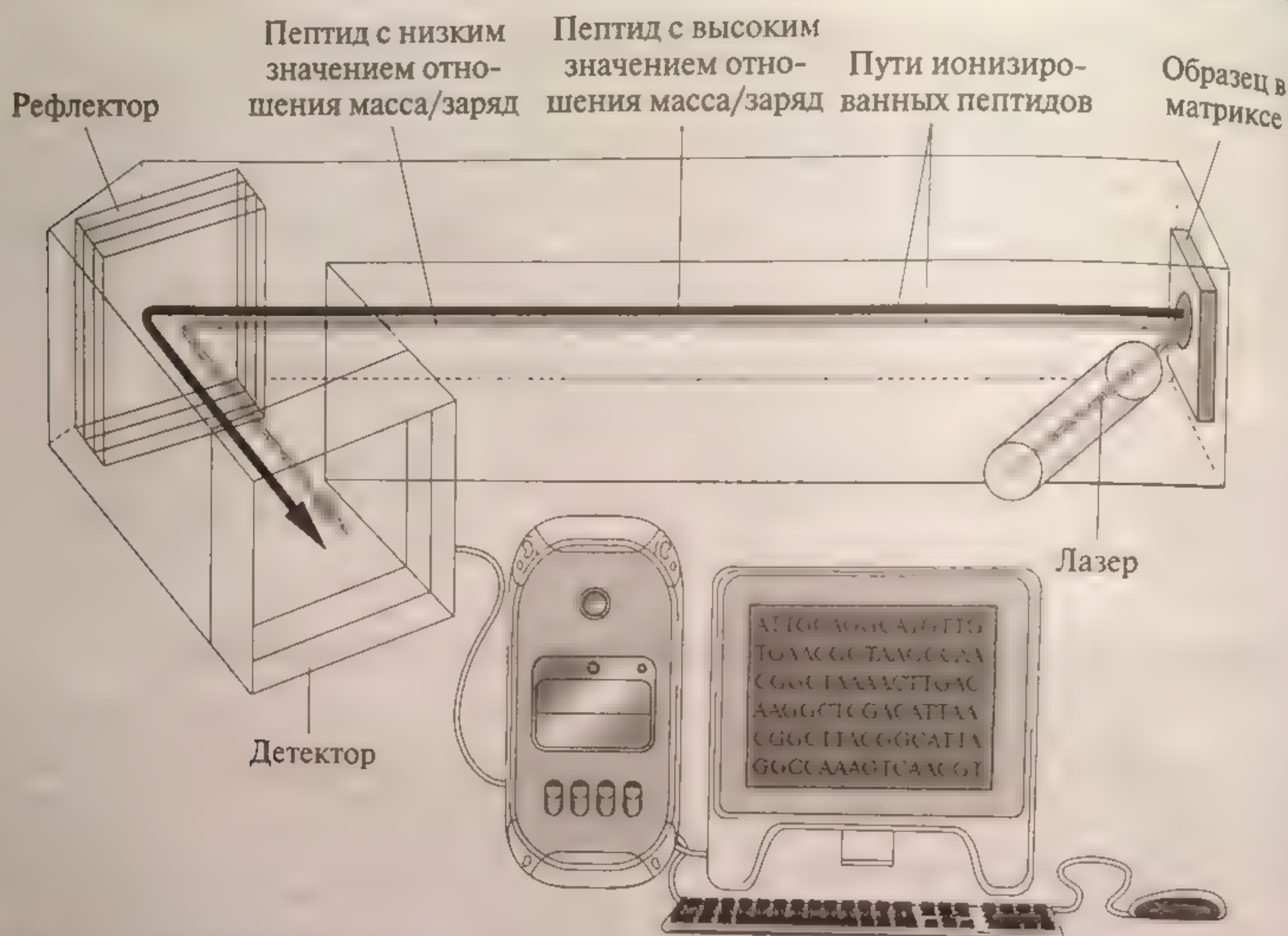


Рис. 2-13 Масс-спектрометрия MALDI-TOF. Образец (или вещество для анализа) заключено в матрикс, который может поглощать лазерную энергию и освобождать ее в виде тепла. Кратковременные лазерные импульсы вызывают испарение образца и матрикса и эмиссию газофазных ионов, которые перемещаются вдоль пролетной трубки и, отражаясь от рефлектора, попадают на детектор ионов. Время пролета связано с величиной, равной отношению массы ионов к их заряду, что позволяет точно определять массы.

занных) триптических пептидов. Затем делаются попытки установить соответствие между этими предсказанными массами и молекулярными массами полученными экспериментально.

- создается список соответствий. Если несколько пептидов соответствуют одному и тому же белку в базе данных, появляется основание утверждать, что получено полное соответствие. Соответствие может быть найдено не для всех пептидов из-за существования непредвиденных посттрансляционных модификаций, различных вариантов сплайсинга и полиморфизмов.

В тех случаях, когда соответствия не могут быть получены, можно использовать более жесткие методы tandemной масс-спектропии (MS/MS) для фрагментации пептидов и вычисления масс фрагментированных ионов. И тогда можно проводить поиск по менее сложным базам данных белковых последовательностей, включая коллекции EST, для получения частичного соответствия. Фрагменты также могут быть собраны в «лестницы» пептидов, массы которых можно сравнивать со стандартными таблицами аминокислот, с целью определения последовательности *de novo* (рис. 2-14).

Расщепление трипсина

Рис. 2-14 Аннотация электрофорезом масс-спектрометрии пептидов, которые следовательно тандемную масс-спектрометрию каждого пептида, получены интерпретировать, вальностей,

Применение

Э
для
ное
руж
тис
тем
ся
ле
го
м
о
Р
I

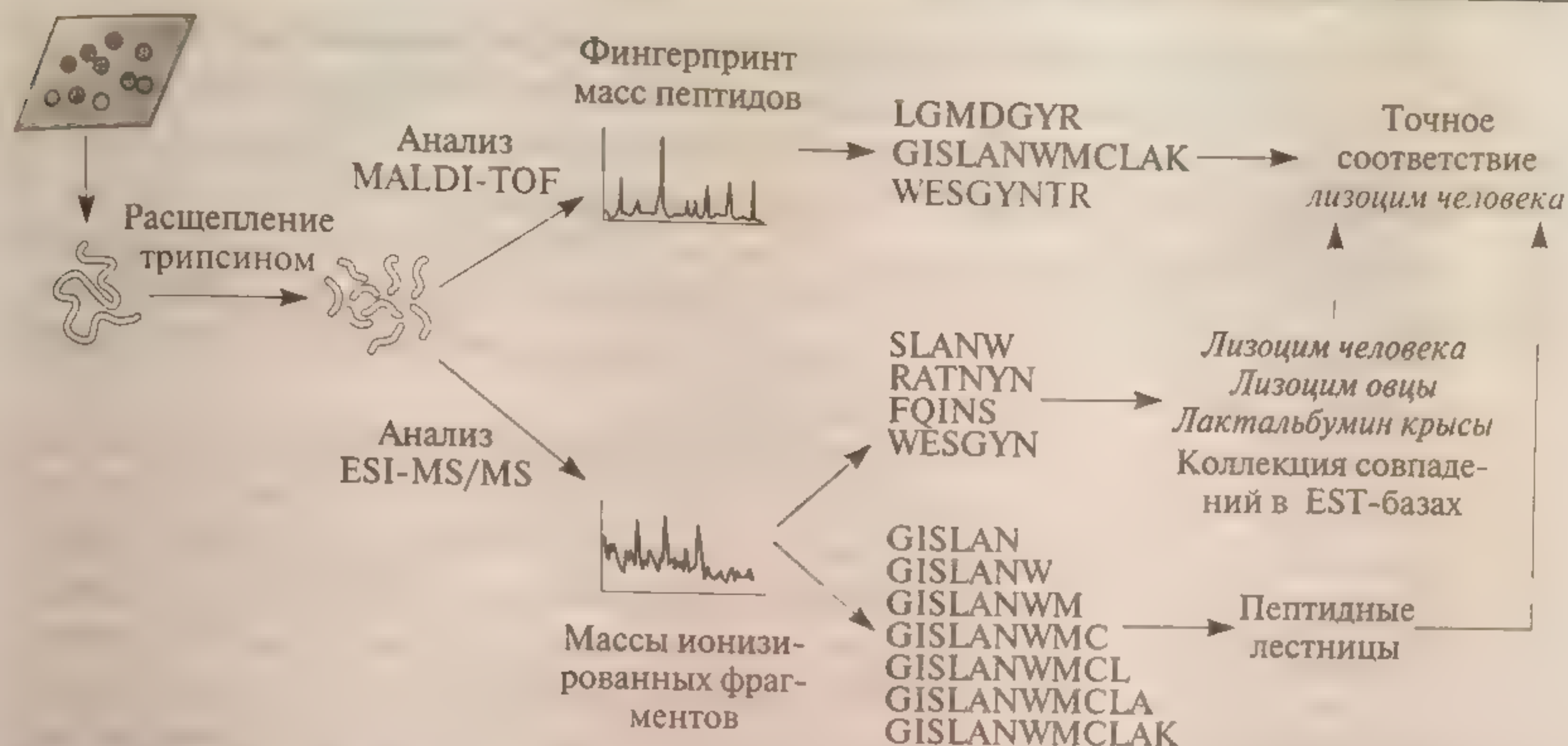


Рис. 2-14 Аннотация белков масс-спектрометрией. Образец белка, выделенный двумерным электрофорезом или другим методом разделения, расщепляется трипсином и помещается в масс-спектрометр. Анализ MALDI-TOF позволяет определять массы интактных триптических пептидов, которые можно сравнивать с базами данных белков с целью выявления сходных последовательностей (фингерпринтирование масс пептидов). Можно использовать другой метод, тандемную масс-спектрометрию (ESI-MS/MS), для определения масс ионизированных фрагментов каждого пептида. Поиск в базах данных можно проводить с использованием полностью неинтерпретируемых спектров MS/MS, с использованием коротких пептидных последовательностей, полученных из частично интерпретируемых масс-спектров, или более длинных последовательностей, полученных *de novo* из полностью интерпретируемых масс-спектров.

Применение экспрессионной протеомики

Экспрессионная протеомика, как и транскриптомика, используется для идентификации новых маркеров болезней или белков, количественное содержание которых коррелирует с конкретными изменениями в окружающей среде (например, присутствие лекарств или токсинов). Идентификация дифференциально экспрессирующихся белков достигается тем же путем, что и идентификация дифференциально экспрессирующихся транскриптов. Для этого проводят сравнение множества двумерных гелей с целью выявления пятен, различающихся по интенсивности; в другом варианте белки из двух образцов перед разделением метят различными флуорофорами, и тогда белки, количество которых в одном из образцов повышено или понижено, могут быть идентифицированы по характерному спектру эмиссии. Этот последний метод известен как **дифференциальный гель-электрофорез (ДИГЭ, или англ. DIGE)**. Альтернативный подход, который может быть реализован в комбинации с ВЭЖХ, — использование **аффинных изотопных меток (ICATs, isotope-coded affinity tags)**. Эти метки представляют собой изотопы с различными массами, которые можно различать с помощью масс-спектрометра. Тяжелые и легкие метки вводят в различные образцы (например, здоровые и больные ткани), а

затем образцы смешивают непосредственно перед выделением белков, так что потери при выделении одинаковы. Белки разделяют двумерным электрофорезом или ВЭЖХ, и фракции анализируют масс-спектрометрией. В каждой фракции измеряют относительное содержание двух изотопов, и значительные различия указывают на то, что белок в конкретной фракции присутствует либо в большем, либо в меньшем количестве в случае больной ткани. Этот белок может быть затем исследован как потенциальный маркер болезни или мишень для лекарств.

Дифференциальная экспрессия белков была использована для идентификации ряда полезных маркеров и потенциальных мишеней лекарств, включая такие, как ядерный антиген пролиферирующих клеток (повышенная экспрессия в случае рака груди) и циклооксигеназа 2 (пониженная экспрессия в случае колоректального рака). Как было указано выше, в случае детской лейкемии наблюдается повышенная экспрессия белка статмина (в фосфорилированной форме). Было идентифицировано несколько маркеров неблагоприятной (необычной) реакции на лекарства, например, резкое уменьшение содержания кальций-связывающего белка калбиндина в ответ на введение иммуносупрессанта циклоспорина А. Это лекарство, используемое для предотвращения у детей отторжения органов при трансплантации, имеет нефротоксические побочные эффекты, включая кальцификацию почечных канальцев. Потеря калбиндина свидетельствует о молекулярной основе этих неблагоприятных эффектов и указывает на возможность устранения последних путем восстановления уровня калбиндина.

Биотехнологические основы протеомики взаимодействий

Такие методы, как аффинная хроматография и коиммунопреципитация, в течение многих лет использовались для изучения взаимодействий между индивидуальными белками. Относительно недавно их начали применять для систематической идентификации компонентов белковых комплексов, включая такие, как человеческая сплайсосома, комплекс ядерной поры и анафаза-стимулирующий комплекс (который может играть роль в предотвращении рака). Комплексы выделяют с помощью антител, которые узнают один из белков, поэтому клетки следует лизировать осторожно, чтобы сохранить взаимодействия внутри комплекса. Комплексы затем можно непосредственно анализировать масс-спектрометрией или после электрофоретического разделения на индивидуальные компоненты (рис. 2-15). Такой подход дает возможность определить все белки, функционирующие в комплексе, а также выявить функцию одного или более генов-сирот. Например, анализ сигнального пути эпидермального фактора роста с использованием этого метода позволил идентифицировать девять компонентов, семь из которых уже были известны, один был известен как белок, но его роль в сигнальном пути эпидермального фактора роста (ЭФР, или *англ.* EGF) не была известна, и еще один белок был полностью неохарактеризо-

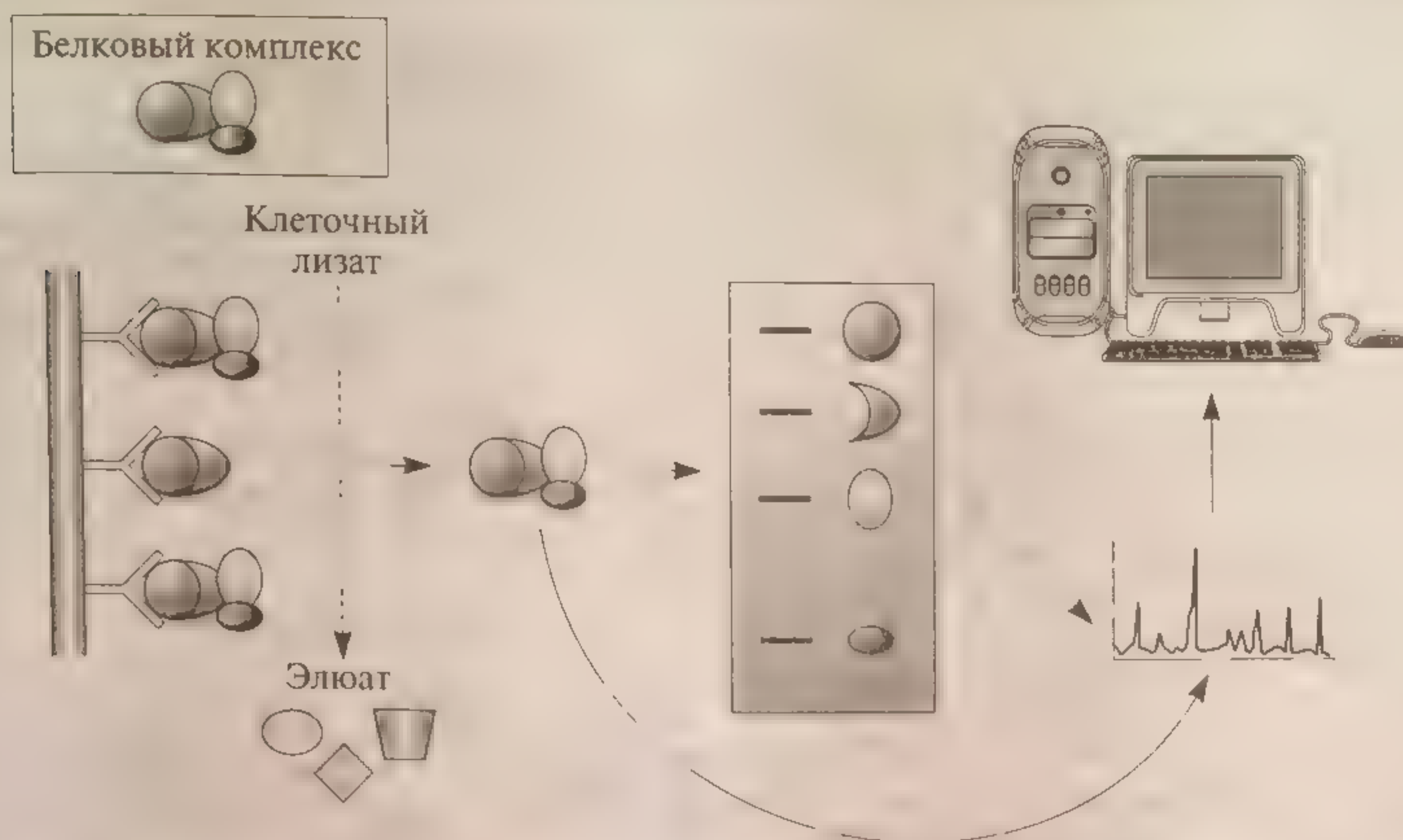


Рис. 2-15 Анализ белковых комплексов. Комплекс из четырех компонентов может быть выделен из клеточного лизата аффинной хроматографией, при которой клеточный лизат проходит через хроматографическую колонку, содержащую носитель. На носителе иммобилизован «улавливающий» агент, например антитело, узнающее один из компонентов комплекса. Другие белки, не являющиеся частью комплекса, вымываются. Комплекс затем может быть снят с колонки и проанализирован масс-спектрометрически либо непосредственно, либо после электрофоретического разделения компонентов в геле.

ванным. Сигнальный путь ЭФР связан с процессом развития нескольких видов рака, так что этот эксперимент позволил выявить еще две потенциальные мишени для лекарств.

Скрининг взаимодействий в большем масштабе может быть осуществлен с помощью **фагового дисплея** (рис. 2-16) или с помощью **дрожжевой двугибридной системы** (рис. 2-17). Каждая из этих систем основана на создании необходимых библиотек и включает использование бейт-белков (белков-ловушек, *от англ. bait-protein*) для «улавливания» взаимодействующих с ними партнеров, называемых пре-белки (белок-добыча, *от англ. prey-protein*). При фаговом дисплее бейт-белок наносят на микротитровальный планшет (чашку). Создается фаг-дисплейная библиотека путем присоединения генов потенциальных пре-белков к гену белка фаговой оболочки, так что каждый из белков экспрессируется в виде белка, слитого с белком оболочки, и оказывается на поверхности фага. Затем смесью миллионов различных белков фагового дисплея обрабатывают микротитровальный планшет. После кратковременной инкубации фаговую библиотеку «смывают» (удаляют), и остаются только фаги, содержащие белки, способные взаимодействовать с бейт-белком. Их можно элюировать и использовать для инфицирования бактерий, что позволит получить набор гомогенных популяций фагов, из которых могут быть выделены и идентифицированы гены пре-белков.

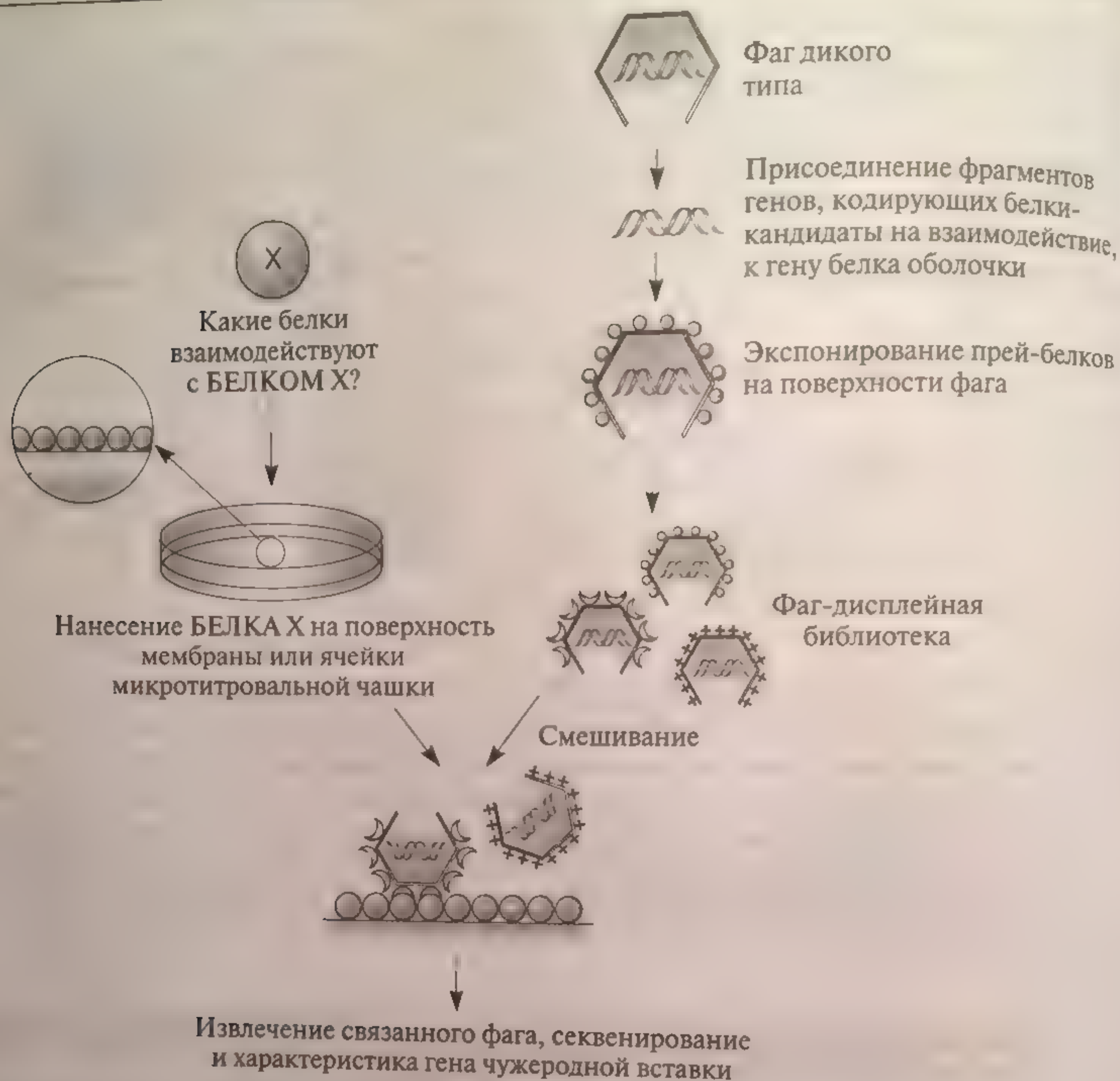


Рис. 2-16 Принцип метода фагового дисплея для анализа белковых взаимодействий. Бейт-белок (X) прикреплен к поверхности твердого субстрата, например мембраны или микротитровального планшета. Затем создаются экспрессионные библиотеки бактериофагов, в которых множество различных белков экспрессируется в виде белков, слитых с белком фаговой оболочки. В результате они оказываются экспонированными на поверхности фаговых частиц. Библиотеку фагового дисплея помещают на микротитровальный планшет (чашку), инкубируют в течение короткого периода и смывают. Остаются только те белки фагового дисплея, которые взаимодействуют с белком X. Их можно извлечь, амплифицировать и идентифицировать путем секвенирования чужеродной вставки в ген белка оболочки.

Дрожжевая двугибридная система — это исследование *in vivo*, при котором бейт-белок экспрессируется в дрожжах в виде слияния (гибрида) с ДНК-связывающим доменом фактора транскрипции. Все пре-белки экспрессируются в виде белков, слитых с трансактивирующим доменом фактора транскрипции. Дрожжевой штамм, содержащий бейт-белок, скрещивают систематически или случайно со штаммами, содержащими библиотеку пре-белков. Продукты скрещивания — диплоидные клетки, содержащие бейт-конструкцию и одну из пре-конструкций библиотеки. Если бейт-белок и пре-белок взаимодействуют, собирается функцио-

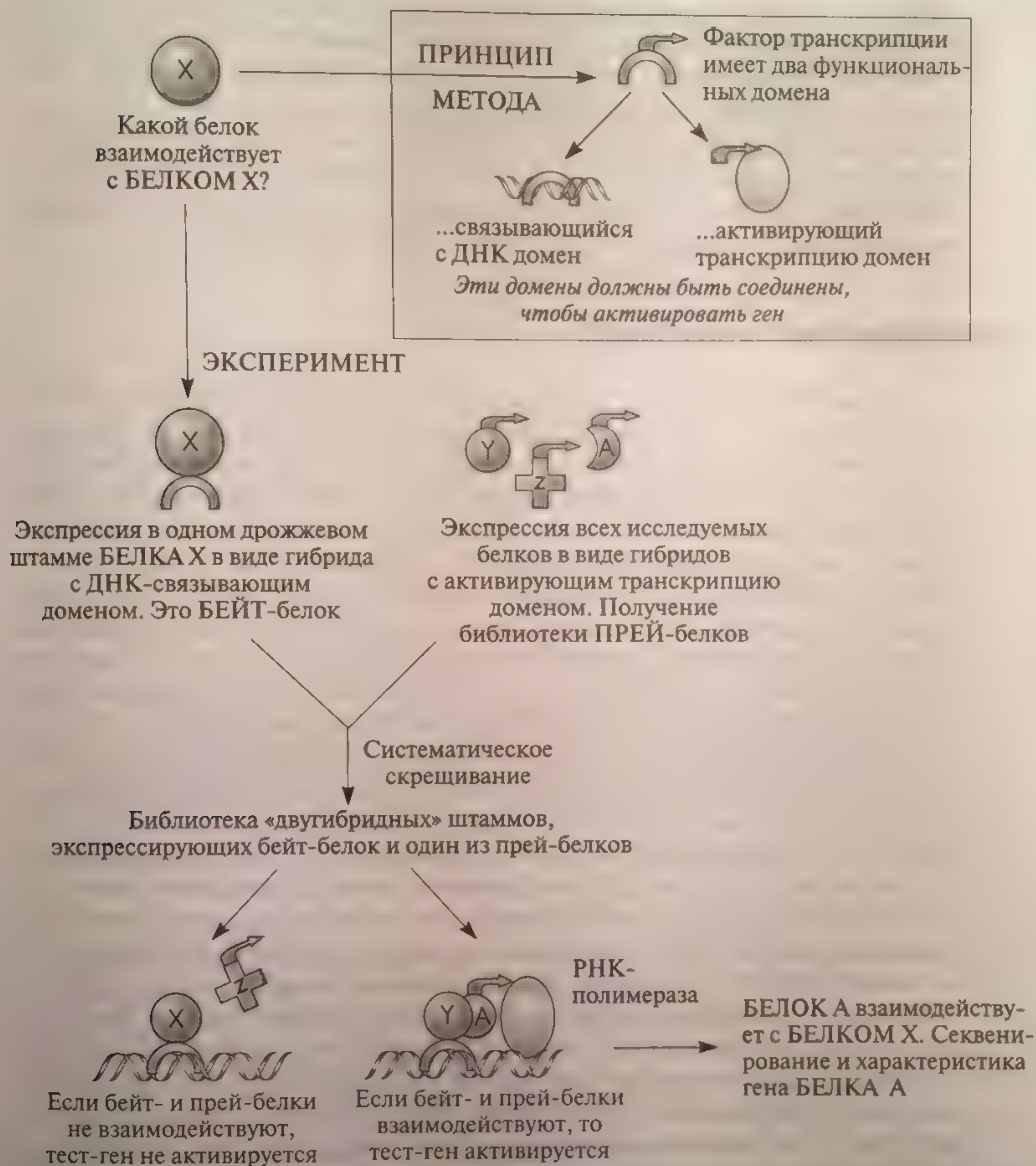


Рис. 2-17 Принцип работы дрожжевой двугибридной системы. Бейт-белок (X) экспрессируется в виде белка, слитого (гибрида) с ДНК-связывающим доменом фактора транскрипции. Затем создаются дрожжевые экспрессионные библиотеки, в которых множество различных белков экспрессируется в виде белков, слитых с активирующим транскрипцию доменом транскрипционного фактора. Скрещивание дрожжевых штаммов, содержащих бейт- и преЙ-белки, приводит к образованию диплоидных клеток, экспрессирующих как бейт-белок, так и кандидатный преЙ-белок. Если между белками есть взаимодействия, то собирается функциональный транскрипционный фактор, и тестируемый ген активируется. Взаимодействующий белок может быть идентифицирован в результате секвенирования конструкции, соответствующей клону в библиотеке преЙ-белков.

нальный транскрипционный фактор, способный активировать тест-ген, который также вводится в клетку. Но если взаимодействия нет, то фактор транскрипции остается в виде двух отдельных гибридных белков, и ген остается неактивным. Масштабный скрининг взаимодействий с использованием двугибридной системы пока не был использован для человеческого протеома, но был использован для исследования белковых взаимодействий в человеческих патогенах (например, вирусе гепатита С), а пробные исследования недавно были проведены на протеоме мыши.

Мутационная геномика

Все рассмотренные выше методы функциональной геномики помогают установить молекулярные/биохимические или клеточные функции. Некоторые из них позволяют получить данные о биологических (на уровне всего организма) функциях, но ни один не дает возможности установить прямую связь между генами и болезнью. Прямой подход предполагает введение мутаций в гены модельных организмов, например мыши, и поиск фенотипов, обнаруживающих симптомы, характерные для человеческих болезней. Как обсуждается в гл. 8, ранее модели болезней получали случайным мутагенезом и методами направленного нокаута (выключения) генов. Но совсем недавно возрос интерес к осуществлению **программ мутагенеза всего генома** с целью создания **полных библиотек мутантов**, содержащих мутации (хиты, или *англ.* hits), оказавшие наиболее сильное влияние на функцию каждого из генов. Эти библиотеки могут быть использованы как основной «банк» мутантов; например, если исследователи с помощью другого экспериментального подхода установят связь определенного гена с заболеванием, то можно будет «заказать» соответствующий мутант и использовать в изучении молекулярных основ возникновения болезни, а также для разработки и тестирования новых лекарственных препаратов.

Идея геномного мутагенеза (**насыщающего мутагенеза**) не нова. Действительно, этот подход использовался в течение многих лет для обнаружения мутаций, влияющих на конкретный биологический процесс. Отличие подхода функциональной геномики в том, что если раньше ученые выбрасывали не интересующие их мутанты, то теперь интерес представляют все мутанты. Недавно проведенный на мышах скрининг мутантов с использованием мощного химического мутагена этилнитрозомочевина (ЭНМ) включал анализ около 40000 линий с целью выявления фенотипов, представляющих интерес для различных аспектов медицины, включая аллергию, иммунологию (иммунологические свойства), физиологию, дефекты развития, поведение и клиническую биохимию.

Помимо проведения химического мутагенеза существуют проекты по мутагенезу генома мыши с применением **мутагенов на основе ДНК**. Это подразумевает использование последовательностей ДНК, которые вводят в геном с целью направленного разрушения генов и получения фенотипов, характерных для болезни. Преимущество этого подхода перед хими-

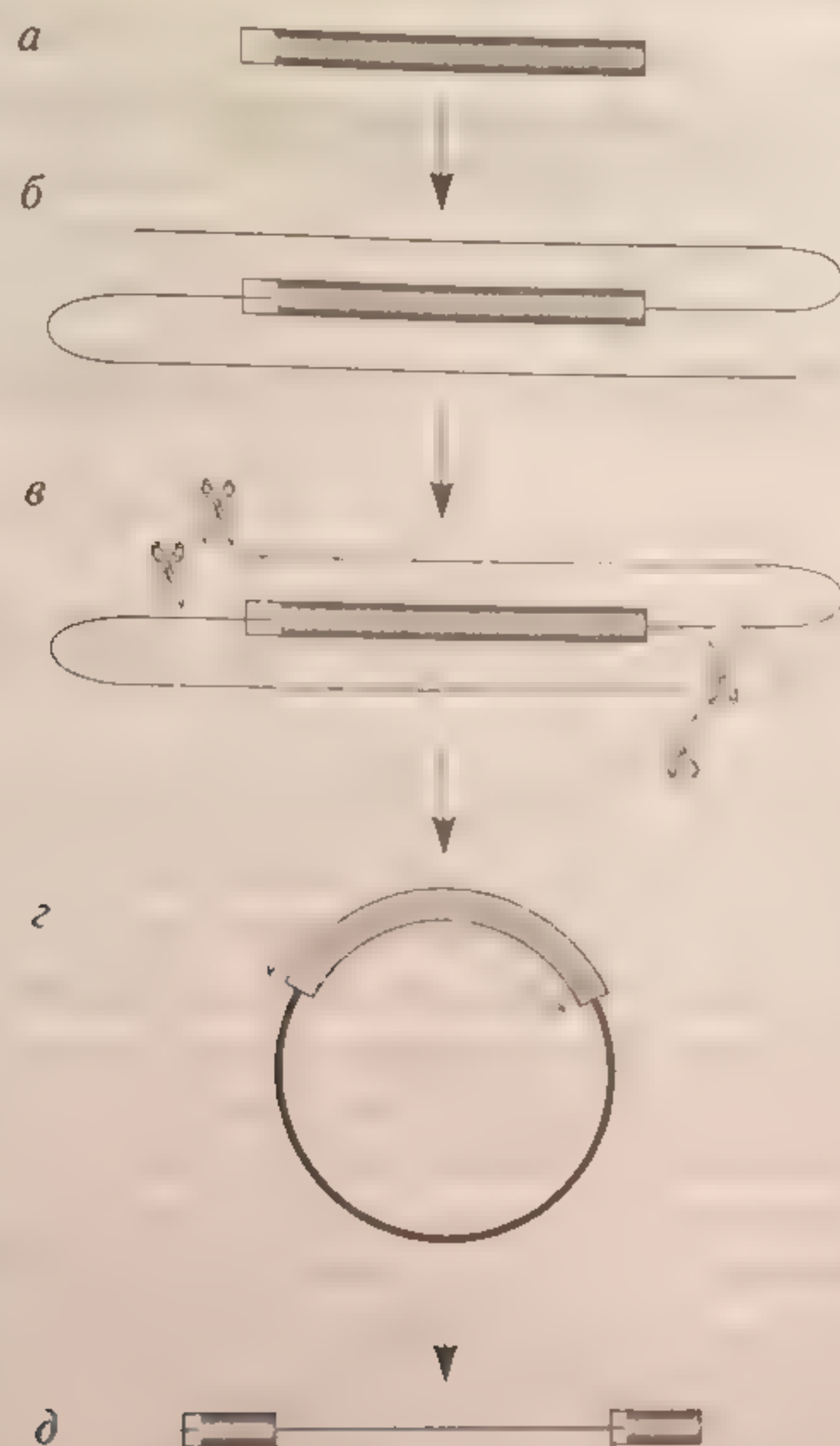


Рис. 2-18 Инвертированная (обратная) ПЦР — один из нескольких методов идентификации генов, разрушенных инсерционным мутагенезом. *а* — инсерционный вектор; *б* — интеграция вектора в геномную ДНК; *в* — расщепление геномной ДНК ферментами рестрикции, которые не расщепляют ДНК внутри вектора; *г* — замыкание в кольцо геномной ДНК с помощью ДНК-лигазы и отжиг с ПЦР-праймерами, обращенными в **обратную сторону** от инсерционного вектора; *д* — амплификация с помощью ПЦР геномных последовательностей, фланкирующих вставку.

ческим (или радиационным) мутагенезом в том, что поврежденный ген содержит вставку чужеродной последовательности. Такая вставка может быть обнаружена гибридизацией или ПЦР, что приводит к быстрой изоляции гена и его идентификации (рис. 2-18). Таким образом, трудный и временами тернистый путь от гена к болезни превращается в движение по современной автостраде: указанный метод является быстрым средством идентификации генов, ответственных за конкретное проявление болезни.

Мутагенез на основе ДНК привлекателен и по другим причинам. Если встраиваемую в геном конструкцию необходимым образом модифицировать, она может давать ценную информацию о некоторых свойствах разрушенного гена, например о характере его экспрессии. Это достигается путем помещения внутрь конструкции **репортерного гена** (ген с легко детектируемым продуктом) таким образом, чтобы его активность стала зависимой от промотора разрушенного гена (рис. 2-19а). Репортерный ген *lacZ* из бактерии *E. coli* продуцирует фермент β -галактозидазу, которая способна переводить бесцветный субстрат (X-gal) в голубой осадок. Если конструкция, содержащая ген *lacZ*, встраивается внутрь гена, который в норме экспресси-

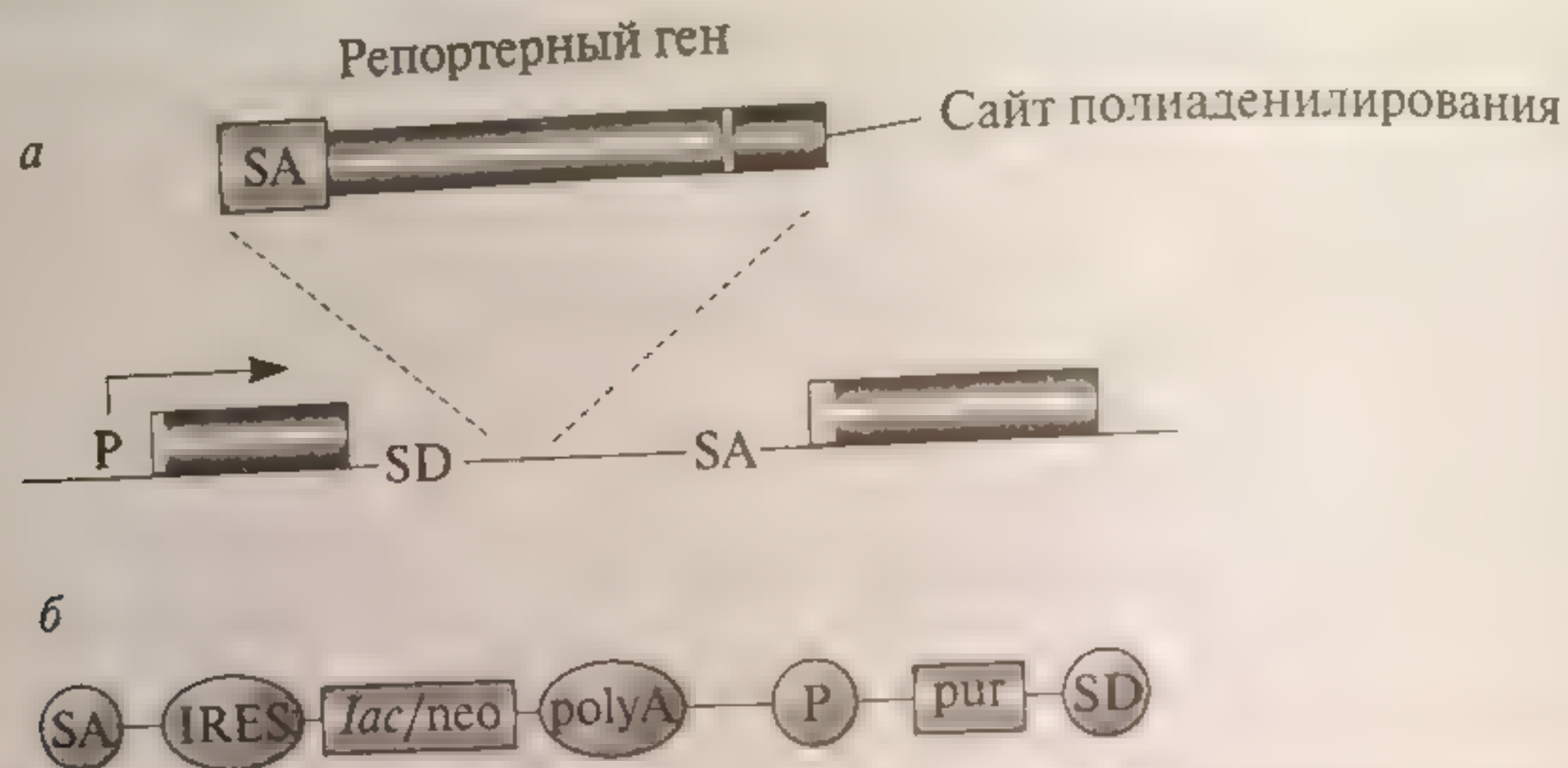


Рис. 2-19 Векторы для улавливания генов. *a* — генная ловушка содержит акцепторный участок сплайсинга (SA), репортерный ген и сайт полиаденилирования. Если эта структура интегрируется внутрь имеющегося гена, в интрон или экзон, она выступает в роли конечного экзона, что приводит к нарушению нормальной функции гена и к экспрессии укороченного продукта слияния, который обладает репортерной функцией и позволяет следить за нормальной экспрессией гена. Однако такая система зависит от активности промотора эндогенного гена, в результате многие гены оказываются пропущенными из-за низкого уровня экспрессии или ограниченной экспрессии; *б* — более усовершенствованная генная ловушка содержит описанные выше элементы, а также второй ген, являющийся селекционирующим маркером. Он контролируется конститутивным промотором (P) и имеет донорный участок сплайсинга (SD), который делает полиаденилирование зависимым от разорванного гена. При селекции клетки или животные будут выживать, только если конструкция разрушила эндогенный ген, но при этом не имеет значения, экспрессируется ген или нет.

руется в поджелудочной железе, то ген мутирует (надо надеяться, что при этом будет получен фенотип болезни). В поджелудочной железе начинает вырабатываться β -галактозидаза, что можно обнаружить окрашиванием с помощью X-gal образцов ткани или целых зародышей. Поскольку только 3% генома мыши приходится на гены, такой подход «генных ловушек» позволяет идентифицировать продуктивные вставки, даже если большая часть интегрированных фрагментов оказывается внутри межгенной ДНК. Недостатком стандартного метода генных ловушек является то, что экспрессия репортерного гена связана с экспрессией разрушенного гена, так что если последний не экспрессируется, то не экспрессируется и репортерный ген. С целью решения этой проблемы в искусственную конструкцию вводится второй ген. Он является селекционирующим маркером и его экспрессия необходима для выживания клетки, при этом полиаденилирование зависит от разрушенного гена (рис. 2-19б). Этот вариант метода был реализован в широком масштабе на мышах в рамках двух проектов. Один из них организован Немецким консорциумом генных ловушек (цель которого заключалась в создании и характеристике 20 тыс. линий, полученных методом генных ловушек), а другой был организован американской компанией Lexicon Genetics. В обоих случаях были созданы базы данных последовательностей, фланкирующих вставку. Они доступны исследователям, которые пытаются выявить связи между конкретными генами и болезнью. Кроме того, мутантный штамм мыши может быть предоставлен для дальнейших экспериментов.

Программы по мутагенезу (химическому и на основе ДНК) в настоящее время осуществляются и на других модельных животных, таких как *Drosophila* и *Caenorhabditis*. Однако в обоих случаях используется набирающий популярность новый метод функциональной инактивации — РНК-интерференция, при котором двуцепочечная РНК процессируется с образованием коротких интерферирующих фрагментов. Последние индуцируют быструю деградацию любой мРНК с той же последовательностью (см. с. 241). Этот метод был использован для инактивации около 95% генов в нематоде, которая, как указано выше, содержит 60% генов, родственных человеческим генам болезней, и позволяет создавать модели ряда болезней. Метод РНК-интерференции может также использоваться непосредственно при работе с клетками человека для изучения фенотипических свойств на клеточном уровне. Многие болезни, влияющие на основные клеточные процессы (например, в случае пигментной ксеродермы нарушена репарация ДНК), теперь можно моделировать в клеточной культуре с помощью РНК-интерференции. Возможно, это единственный в настоящее время метод, который позволяет осуществлять широкомасштабный и прямой анализ функций генов человека.

Дополнительная литература

POGM: Гл. 5 знакомит читателя с высокочувствительными векторами для секвенсирования. Гл. 7 дает обзор методов секвенирования и знакомит читателя с подходами к анализу последовательностей и биоинформатикой. В гл. 13 обсуждается использование генных ловушек и инсерционных векторов в клонировании и идентификации генов.

POGA: В гл. 3 и 4 обсуждаются подходы к созданию физических карт генома. В гл. 5 обсуждается разработка технологических подходов к секвенированию геномов, учитывающих необходимость автоматизации. В гл. 6 рассмотрены методы биоинформатики и методы аннотирования генома. В гл. 7–11 более детально обсуждены биотехнологические основы и приложения функциональной геномики, включая сравнительную геномику (гл. 7), сравнение последовательностей и структур (гл. 8), экспрессионное профилирование в транскриптомике и протеомике (гл. 9), создание полных библиотек мутантов (гл. 10) и анализ белковых взаимодействий (гл. 11).

Новейшие обзоры, посвященные технологическим основам и приложениям протеомики и мутационной геномики:

Aebersold R, Cravatt BF (2002) Proteomics — advances, applications and the challenges that remain. *Trends Biotechnol* 20 (Suppl 12), S1–2.

Coelho PSR, Kumar A, Snyder M (2000) Genome-wide mutant collections: toolboxes for functional genomics. *Curr Opin Microbiol* 3, 309–315.

Drewes G, Bouwmeester T (2003) Global approaches to protein-protein interactions. *Curr Opin Cell Biol* 15, 1–7.

Lee KH (2001) Proteomics: a technology-driven and technology-limited discovery science. *Trends Biotechnol* 19, 217–222.

Pandey A, Mann M (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, 837–846.

Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP (2001) Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nature Rev Genet* 2, 756–768.

Zhu H, Snyder M (2003) Protein chip technology. *Curr Opin Chem Biol* 7, 55–63.

Подробный обзор, посвященный методам транскриптомики и протеомики. Содержит множество примеров того, как эти методы используются в медицинских исследованиях, а также для разработки новых лекарственных препаратов:

Celis JE, Kruhoffer M, Gromova I et al. (2000) Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Lett* 480, 2–16.

Статья, демонстрирующая важную роль сравнительной геномики в предсказании генов и установлении их функций:

Clark MS (1999) Comparative genomics: the key to understanding the Human Genome Project. *Bioessays* 21, 12 1–130.

Три великолепных обзора, иллюстрирующих значимость проекта «Геном человека» для медицинских исследований:

Collins FS, McKusick VA (2001) Implications of the human genome project for medical science. *J Am Med Assoc* 285, 540–544.

Subramanian G, Adams MD, Venter JC, Broder S (2001) Implications of the human genome for understanding human biology and medicine. *J Am Med Assoc* 286, 2296–2307.

Van Ommen GJ (2002) The Human Genome Project and the future of diagnostics, treatment and prevention. *J Inherit Metab Dis* 25, 183–188.

Davies K (2001) *Cracking the Genome: Inside the Race to Unlock Human DNA*. Free Press, New York.

Прекрасное описание технологии секвенирования генома:

Green ED (2001) Strategies for the systematic sequencing of complex genomes. *Nature Rev Genet* 2, 573–583.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.

Хорошо написанная критическая статья, которая прослеживает историю программ ELSI и оценивает их возможности при решении задач, поставленных в рамках проекта «Геном человека»:

McCain L (2002) Informing technology policy decisions: the US Human Genome Project's ethical, legal, and social implications programs as a critical case. *Technol Soc* 24, 111–132.

Всестороннее обсуждение того, как ищут гены в геномной ДНК:

Stein L (2001) Genome annotation: from sequence to biology. *Nature Rev Genet* 2, 493–503.

Серия обзоров, посвященных разработке и использованию микрочипов. Последняя в списке короткая статья посвящена использованию сиквенсного сэмплинга:

Various authors (1999) The Chipping Forecast. *Nature Genet* 21 (Suppl), 1–60.

Various authors (2002) The Chipping Forecast II. *Nature Genet* 32 (Suppl), 465–551.

Velculescu VE, Vogelstein J (2000) Analysing uncharted transcriptomes with SAGE. *Trends Genet* 16, 423–425.

Книга, посвященная описанию проекта Геном Человека финансируемого Консорциумом и фирмой Celera Genomics:

Venter JC, Adams MD, Myers EW et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304–1351.

ГЛАВА

Геномика
инфекции

Микроорга

Вызы
рулентн
от их ко
ганизмо
вирулен
нии тол
мально
стическ
это сво
нии во
вируле
чески
тен, м
Для ч
это ха
М
бакте
Виру
вых
кисл
тип
ная
на.
мы
ко
ви
че
к
в
в

Геномика и ее роль в лечении инфекционных заболеваний

Микроорганизмы, вызывающие заболевания

Вызывающие болезни микробы часто называют патогенными, или вирулентными. Это означает, что они провоцируют инфекции независимо от их количества, пути проникновения или присутствия других микроорганизмов, т. е. патогены отличаются от непатогенов экспрессией факторов вирулентности. Такая концепция, по-видимому, справедлива в отношении только определенных микробов, вызывающих заболевания у нормальных хозяев; существует много других микроорганизмов (оппортунистические патогены), для которых она не выполняется. Вирулентность — это свойство микробов, однако проявляется оно только при инфицировании восприимчивых хозяев (организмов). Таким образом, так называемые вирулентные организмы могут быть авирулентны для хозяев со специфическим иммунитетом, в то время как микроб, который обычно авирулентен, может вызывать заболевание у хозяев с ослабленным иммунитетом. Для человека самый важный аспект взаимодействия «микроб—хозяин» — это характер и степень нанесенного организму вреда.

Микробы, вызывающие болезнь, делятся на четыре категории: вирусы, бактерии, грибы и протозойные (простейшие одноклеточные организмы). Вирусы отличаются от трех других групп организмов целым рядом ключевых признаков. Во-первых, они содержат только один тип нуклеиновых кислот (РНК или ДНК), в то время как клеточные организмы содержат оба типа. Во-вторых, для воспроизводства им необходима только их собственная нуклеиновая кислота, т. е. вирусная нуклеиновая кислота инфекционна. Клеточные организмы, напротив, воспроизводятся с участием всей суммы собственных компонентов клетки. В-третьих, различные структурные компоненты вируса синтезируются отдельно, а затем собираются в зрелые вирусные частицы. Рост клеток происходит путем количественного увеличения всех составляющих компонентов, при этом сохраняется целостность клетки. В-четвертых, вирусы не имеют рибосом и зависят от клеток-хозяев в смысле обеспечения аппарата для синтеза вирусных белков. Наконец, у вирусов отсутствуют какие-либо биохимические пути синтеза АТФ.

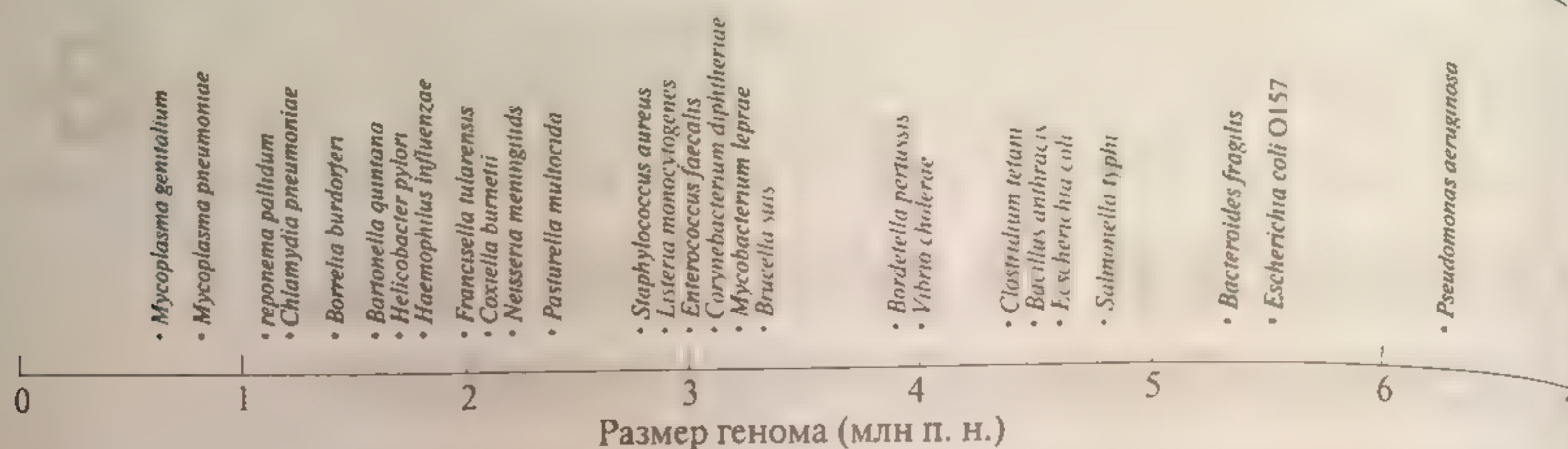


Рис. 3-1 Диапазон размеров геномов различных бактериальных патогенов.

Из сказанного должно быть ясно, что вирусы — облигатные внутриклеточные паразиты, которые сильно зависят от биохимических процессов хозяина, обеспечивающих их репликацию. Эта особенность вирусов имеет ряд последствий для охраны человека. Во-первых, все известные вирусы, инфицирующие человека, вызывают болезнь в результате воздействия на хозяйскую клетку. Во-вторых, производство противовирусных препаратов затруднительно, так как большинство агентов, которые препятствуют размножению вирусов, также влияют на важнейшие клеточные процессы. По этой причине наиболее эффективный подход — предупреждение вирусной инфекции путем вакцинации. Тем не менее расширение наших представлений о молекулярных механизмах репликации вирусных нуклеиновых кислот способствует разработке клинически важных противовирусных препаратов (см. с. 116).

Большое число различных бактерий способно вызывать болезни у людей и животных. Среди них есть патогены с самыми маленькими клеточными геномами (микоплазмы) и самыми большими бактериальными геномами (*Pseudomonas aeruginosa*) (рис. 3-1). Некоторые из этих бактерий — облигатные внутриклеточные паразиты, и секвенирование генома позволило обнаружить причину этой облигатности: отсутствие генов, необходимых для некоторых важнейших метаболических путей (табл. 3-1). Фи-

Таблица 3-1 Примеры отсутствия метаболических реакций у микроорганизмов, что приводит к их облигатному внутриклеточному росту

Организм	Отсутствующие биохимические реакции
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Цикл ТСА (ТКК — цикл трикарбоновых кислот); биосинтез пуринов, пиримидинов и аминокислот
<i>Treponema pallidum</i>	Цикл ТСА; биосинтез пуринов, пиримидинов и аминокислот
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Гликолиз; биосинтез пуринов, пиримидинов и аминокислот
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Цикл ТСА; биосинтез пуринов и пиримидинов
<i>Mycobacterium leprae</i>	Частичная утрата гликолиза и цикла ТСА

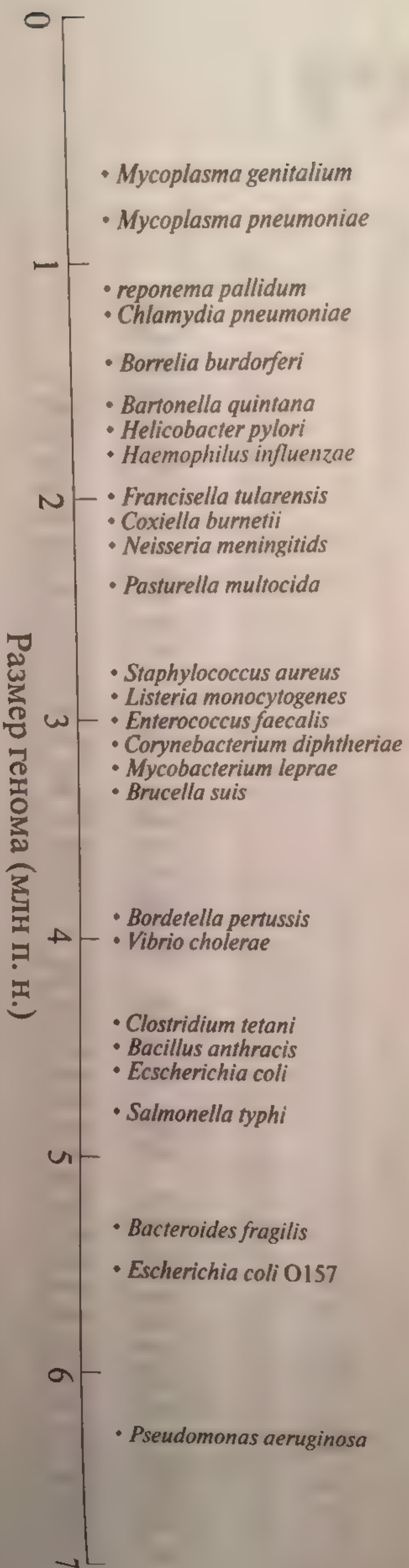


Рис. 3-1 Диапазон размеров геномов различных бактериальных патогенов.

Из сказанного должно быть ясно, что вирусы — облигатные внутриклеточные паразиты, которые сильно зависят от биохимических процессов хозяина, обеспечивающих их репликацию. Эта особенность вирусов имеет ряд последствий для охраны человека. Во-первых, все известные вирусы, инфицирующие человека, вызывают болезнь в результате воздействия на хозяйскую клетку. Во-вторых, производство антивирусных препаратов на хозяйскую клетку. Во-вторых, производство антивирусных препаратов на хозяйскую клетку, так как большинство агентов, которые пре-

Таблица 3-2 Бактериальные патогены, против которых имеется вакцина

Организм	Болезнь
<i>Bacillus anthracis</i>	Сибирская язва
<i>Bordetella pertussis</i>	Коклюш
<i>Clostridium tetani</i>	Столбняк
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Дифтерия
<i>Haemophilus influenzae</i>	Менингит
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Туберкулез
<i>Neisseria meningitidis</i> (некоторые штаммы)	Менингит
<i>Salmonella paratyphi</i> A & B	Паратиф А и В
<i>Salmonella typhi</i>	Тиф
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Пневмония
<i>Vibrio cholera</i>	Холера

зиологические исследования и секвенирование генома также позволили установить то, что несмотря на различие в метаболизме у болезнетворных бактерий они используют общие механизмы для преодоления защитных механизмов хозяина (см. с. 97).

В борьбе с бактериальными инфекциями традиционно используется два подхода: вакцинация для предотвращения инфекций и лечение инфекций антибиотиками. Для предотвращения инфекций, вызываемых рядом бактерий, существуют вакцины (табл. 3-2). Однако все они, за исключением вакцин против туберкулеза (ТВ) и сибирской язвы, основаны на убитых бактериях, и поэтому вызываемый ими иммунитет непродолжителен. Молекулярная генетика и геномика предлагают ряд методов для создания безопасных, ослабленных вакцин, и более детально это будет описано далее (см. с. 104).

Изначально термин «антибиотик» использовался для обозначения любого микробного продукта, который в низкой концентрации может ингибировать или убивать другие микроорганизмы. Первый пример классического антибиотика — пенициллин; многие подобные ему антибиотики, используемые в настоящее время, были найдены путем скрининга большого числа микробов на предмет их способности секретировать вещества, которые бы ингибировали рост одного или более патогенов. Эти антибиотики могут быть использованы в клинической практике, поскольку биохимические процессы, на которые они воздействуют, отсутствуют в клетках млекопитающих. Например, пенициллин и ряд других антибиотиков препятствуют синтезу бактериальной клеточной стенки, в то время как другие нацелены на компоненты, характерные только для прокариотических рибосом. Сегодня термин антибиотик

используется для обозначения любых природных, полусинтетических и полностью синтетических антимикробных соединений, которые используются для терапии, и процесс выявления молекул-кандидатов происходит таким же путем, как и в случае других лекарств. Методы работы с генами и подходы, разрабатываемые геномикой, способствуют нашему пониманию механизмов бактериальной патогенности и происхождения эпидемий устойчивости к антибиотикам. Успехи в этой области помогают подбирать новые биохимические мишени для антибиотиков, о чем будет говориться позже в этой главе. Путь создания новых лекарств на основе новых кандидатов-антибиотиков обсуждается в гл. 7.

Многие бактерии опасны тем, что способны вызывать инфекционные заболевания у человека и других млекопитающих. В то же время круг клинически значимых грибов гораздо более ограничен. Многие люди знакомы с поверхностными микозами, такими как стопа атлета, дерматомикоз. Эти кожные инфекции неприятны с эстетической точки зрения, но клинические последствия их минимальны. В отличие от них системные микозы — это инфекции, представляющие угрозу для жизни. Лишь некоторые разновидности грибов являются первичными патогенами, т. е. проникают внутрь здоровых индивидуумов и колонизируют ткани. Главные представители — *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, а также те грибы, которые инфицируют кожу (дерматофиты). Другие важные патогены, такие как грибы рода *Candida*, *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis carinii*, *Rhizopus oryzae* и *Fusarium solani*, являются оппортунистическими патогенами. Эти грибы вызывают угрожающие жизни инфекции у пациентов с сильно ослабленной иммунной системой. Число таких иммунодефицитных пациентов сильно возросло из-за широкого распространения противоопухолевой химиотерапии и увеличения числа случаев СПИДа. Оппортунистические патогены являются хорошей иллюстрацией сделанного в начале этой главы утверждения, что инфекция — следствие случайной встречи микроба с восприимчивым хозяином. *Cryptococcus neoformans* может вызывать негоспитальные инфекции, но в основном действует на иммунодефицитных пациентов. Для большинства упомянутых патогенов наиболее распространенный путь передачи инфекции — вдыхание спор.

Поиск антибиотиков для лечения грибковых инфекций гораздо более трудная задача, чем поиск антибактериальных препаратов, поскольку как мишень, так и хозяин относятся к эукариотам и биохимических различий между ними меньше, чем между бактериями и млекопитающими. Очевидной противогрибковой мишенью является клеточная стенка, но ингибиторы клеточной стенки, как оказалось, имеют ограниченное клиническое применение. До настоящего времени наиболее успешно применяемыми противогрибковыми средствами были азолы, которые действуют на те ступени биосинтеза жирных кислот, которые отсутствуют у высших растений и животных. Как и в случае поиска антибактериальных препаратов, исследования геномики должны способствовать увеличению числа потенциальных мишеней для противогрибковых препаратов.

Таблица 3-3

Организм

*Cryptosporidium**Garcia**Leishmania**Plasmodium**Pneumocystis**Toxoplasma**Trypanosoma**Trypanosoma*Инфекция
развивающаяся

Прост

что они

странах

шинств

(моск

некто

vagina

запад

ними

сторо

микр

вами

очид

ник

бол

ные

сча

бор

Откуда

Таблица 3-3 Распространенные инфекции, вызываемые простейшими

Организм	Болезнь	Способ передачи	Распространенность
<i>Cryptosporidium</i>	Сильная диарея	Зараженная вода	Во всем мире ^a
<i>Giardia</i>	Сильная диарея	Зараженная вода	Во всем мире ^a
<i>Leishmania</i>	Лейшмания	Укусы насекомых	Жаркие/тропические страны
<i>Plasmodium sp</i>	Малярия	Малярийный комар	Жаркие/тропические страны
<i>Pneumocystis carini</i>	Пневмония	Воздушно-капельный	Иммунодефицитные пациенты
<i>Toxoplasma</i>	Токсоплазмоз	Различные	Во всем мире. Возрастающая проблема для иммунодефицитных пациентов (например, СПИД)
<i>Trypanosoma brucei</i>	Сонная болезнь	Муха цеце	Африка
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Болезнь Чагаса	Попадание фекалий насекомых в рот	Южная Америка

^a Инфекции, редко встречающиеся в развитых странах, но широко распространенные в развивающихся странах

Простейшие организмы отличаются от других классов патогенов тем, что они встречаются в основном в тропических и/или слаборазвитых странах (табл. 3-3). Это, в свою очередь, отражает путь их передачи. Большинство простейших распространяется либо через укусы насекомых (москиты, мошки) или в результате употребления зараженной воды, хотя некоторые распространяются половым путем (например, *Trichomonas vaginalis*). Поскольку подобные болезни относительно редко встречаются в западных странах, на разработку эффективных лекарств для борьбы с ними направлено очень мало усилий. Из-за такого отсутствия интереса со стороны властей малярия убивает больше людей во всем мире, чем другие микроорганизмы. В течение многих лет наиболее эффективными средствами для профилактики и лечения таких болезней, как малярия, были очищенные препараты, получаемые из традиционных природных источников, например хинин из коры дерева *Cinchona*. Даже в настоящее время большинство противопротозойных лекарств — синтетические производные активных ингредиентов препарата, получаемого из этого растения. К счастью, на помощь идет геномика, и начали просматриваться новые пути борьбы с малярией (см. с. 113).

Откуда появляются новые болезни?

Время от времени открывают новые инфекционные болезни. Например, большое количество людей, посетивших в 1976 г. Конвенцию американского легиона в Филадельфии, заболели пневмонией, и многие из них

умерли. Микробиологическое исследование тканей легких, взятых на аутопсию, позволило обнаружить новую бактерию, которую впоследствии назвали *Legionella pneumophila*. Почему этот организм не был обнаружен ранее? Причина проста: бактерии вида *Legionella* встречаются повсеместно в природных пресноводных водоемах, хотя обычно составляют только малую часть всего множества бактерий. Однако в отличие от большинства бактерий они могут расти и выживать только при повышенной температуре и поэтому интенсивно размножаются в промышленных и бытовых водопроводных системах. Многие из этих водяных систем, например души, джакузи и кондиционеры, способствуют образованию аэрозолей, и инфицированные капельки легко проникают в легкие через альвеолярные каналы. По существу, именно изменения в образе жизни людей создали условия, которые благоприятствуют распространению *Legionella* в форме, способствующей инфицированию восприимчивых хозяев. Если бы не произошло одновременное заражение большого числа людей, этот «новый» патоген мог бы быть не обнаружен.

Представители *Campylobacter* являются главной причиной бактериальных пищевых отравлений. Как и в случае с *Legionella*, их способность вызывать у человека заболевания не была выявлена вплоть до 1970-х годов. Этому было несколько причин. Во-первых, заметно возросло число случаев пищевых энтеритов, которые не были следствием заражения *Salmonella*, но для которых не было выявлено причинного фактора. Многие из этих случаев энтерита были связаны с употреблением в пищу кур, и поэтому возникали подозрения о возможной бактериальной инфекции. Во-вторых, *Campylobacter* — очень привередливые микроорганизмы, и их лабораторное культивирование требует специальных сред. Только когда число случаев энтерита неизвестной этиологии достигло высокого уровня, начались интенсивные поиски причинного фактора. Следует отметить, что число случаев энтерита нарастало параллельно с ростом потребления куриного мяса. В свою очередь, растущий спрос на кур привел к разработке способов высокопроизводительного разведения этих домашних птиц, что способствовало широкому распространению *Campylobacter*. Опять, как мы видим, изменения в образе жизни способствовали изменению в характере возникновения и распространения инфекционной болезни.

В целом большинство обнаруживающихся вирусных болезней вовсе не являются новыми, они были неизвестны только для западного мира. Эти болезни всегда были свойственны странам третьего мира, и, по-видимому, поражали приезжих из развитых стран. Однако ряд социальных, экономических и бытовых факторов привели к росту заболеваемости. Во-первых, массовое уничтожение тропических лесов заставило животных, местом обитания которых всегда были кроны деревьев, приспособившись к жизни на земле. Многие из этих животных являются резервуарами человеческих болезней, и, находясь ближе к земле, облегчают передачу инфекций насекомым. Во-вторых, быстрый перенос связан с тем, что инфицированные западные приезжие теперь могут возвращаться к себе домой для лечения, в то время как раньше они обычно умира-

Идентификация

Первая и са-
робного возбу-
бор наиболее
формации д-
постоянно н
но внезапно
или вируса
эпидемию
Первичн
правило, в
наблюдаем
раторным
Точность
сока для
которых
предстан
ходило
обитаю
микроб
потом
падны
мя как
потом
ки ле
могу

ли от «лихорадки» прямо «в поле». Дополнительный фактор — нарастающая тенденция проводить отпуск в экзотических местах. В-третьих, во многих развивающихся странах произошло массовое перемещение населения из сельской местности в города, и это способствовало возрастанию осведомленности здравоохранительных органов о масштабах распространения инфекций. Наконец, глобальное потепление ведет к тому, что многие насекомые-переносчики все больше перемещаются в более цивилизованные страны, которые ранее не являлись ареалом их обитания. Тем не менее существует несколько вирусных заболеваний, причина которых неизвестна. Например, лихорадка Эбола чрезвычайно инфекционна и почти всегда приводит к летальному исходу. По-видимому, это заболевание возникло недавно, но почему — неизвестно. Должен существовать резервуар инфекции, но все попытки найти его пока неудачны. Аналогично, эпидемия СПИДа обусловлена ВИЧ (вирусом иммунодефицита человека). Хотя факторы, способствующие распространению СПИДа, известны (половой путь), причины появления этой патологии — все еще остаются предметом споров.

Идентификация возбудителей болезни

Первая и самая главная причина необходимости идентификации микробного возбудителя болезни у каждого заболевшего пациента — это выбор наиболее подходящего способа лечения. Вторая причина — сбор информации для органов здравоохранения. Например, в любом обществе постоянно наблюдается не очень высокий уровень пищевых отравлений, но внезапное увеличение числа заболеваний из-за *Salmonella typhimurium* или вируса гепатита А указывает на какой-то источник, вызывающий эпидемию пищевых отравлений, и этот источник следует выявить.

Первичная идентификация микробной инфекции проводится, как правило, врачом общей практики (терапевтом) на основании симптомов, наблюдаемых у пациента. Первичный диагноз может подтвердиться лабораторными исследованиями взятых у пациента образцов для анализа. Точность диагноза, сделанного на основании симптомов, достаточно высока для болезней, которые характерны для данного района, или для тех, в которых врач как специалист хорошо разбирается. Реальную трудность представляют именно «экзотические» болезни, с которыми врачу не приходилось сталкиваться. Это могут быть болезни, вызываемые микробами, обитающими в тропических регионах или слаборазвитых странах, или микробами, которые ранее были распространены в развитых странах, но потом в основном уничтожены. Например, большинство терапевтов в западных странах никогда не сталкивались со случаями столбняка, в то время как врач, живущий на полуострове Индостан, легко распознает симптомы этой болезни. Аналогичным образом, терапевт из Западной Африки легко распознает малярию у пациента с лихорадкой, но эти симптомы могут привести в замешательство врача из Северной Европы. Эпидемии

«экзотических» болезней также могут иметь своей причиной биотерроризм (дополнение 3-1). «Экзотические» инфекции могут быть следствием путешествий в слаборазвитые страны. Путем изучения истории недавних

Дополнение 3-1 Средства биологической войны

В литературе описано множество вариантов использования микробов в качестве биологического оружия. В последние годы наибольшее внимание общественности (кино, литература) обращено на то, что якобы некие «зловредные» нации заняты массовым производством средств биологической войны и разработкой способов доставки их с помощью ракет («вооружение»). Однако до сих пор главная опасность исходит от местных террористов. Например, в 1993 г. секта «Аум Сенрике» в Японии распылила споры сибирской язвы в Токио. В октябре 2001 г. в США пятеро умерли и еще 12 человек были инфицированы в результате присланных по почте спор сибирской язвы. Затем в январе 2003 г. полиция в Лондоне обнаружила «фабрику» по изготовлению рицина, чрезвычайно сильного токсина из семян клещевины (из семян клещевины получают касторовое масло). Эти события напоминают всем странам о необходимости разработки стратегического плана борьбы с биотерроризмом.

Правительство США разделило все возможные средства биологической войны на три категории в зависимости от уровня риска (табл. ДЗ-1). Поскольку в индустриально развитых странах инфекции категории А и Б очень редко встречаются, большинство терапевтов не способно распознать симптомы. В США в случае сибирской язвы диагностике помогло то, что жертвы имели контакт с «белым порошком», что сразу направило расследование на поиски химического или биологического агента. Даже когда симптомы болезни правильно диагностируются, существует еще одна проблема — отсутствие стандартных методов определения чувствительности изолятов (штаммов возбудителей инфекции) к антибиотикам. В распоряжении медиков имеется много подходящих антибиотиков для использования против штаммов дикого типа (природных изолятов), но есть сведения о разработке штаммов, устойчивых ко всем обычным антибиотикам.

Таблица ДЗ-1

Категория	Характеристики	Примеры
А	Могут легко распространяться и передаваться от человека к человеку Могут быть причиной высокой смертности и потенциально представляют большую угрозу здоровью общества Могут вызывать панику и беспорядки в обществе Требуют специальных действий со стороны системы здравоохранения	<i>Bacillus anthracis</i> (сибирская язва) <i>Yersinia pestis</i> (чума) <i>Francisella tularensis</i> (туляремия) Натуральная оспа Вирусная геморрагическая лихорадка (например, Эбола, Марбург)
Б	Умеренная скорость распространения Вызывает умеренный уровень заболеваемости и смертности Требует увеличения возможностей диагностики и наблюдения на общенациональном уровне	Род <i>Brucella</i> <i>Burkholderia mallei</i> <i>Burkholderia pseudomallei</i> Вирусный энцефалит
В	Вновь появляющиеся патогены, способные оказать сильное влияние на систему здравоохранения, могут быть искусственно переконструированы для массового заражения из-за доступности и легкости производства	Хантавирусы Вирус Нипа

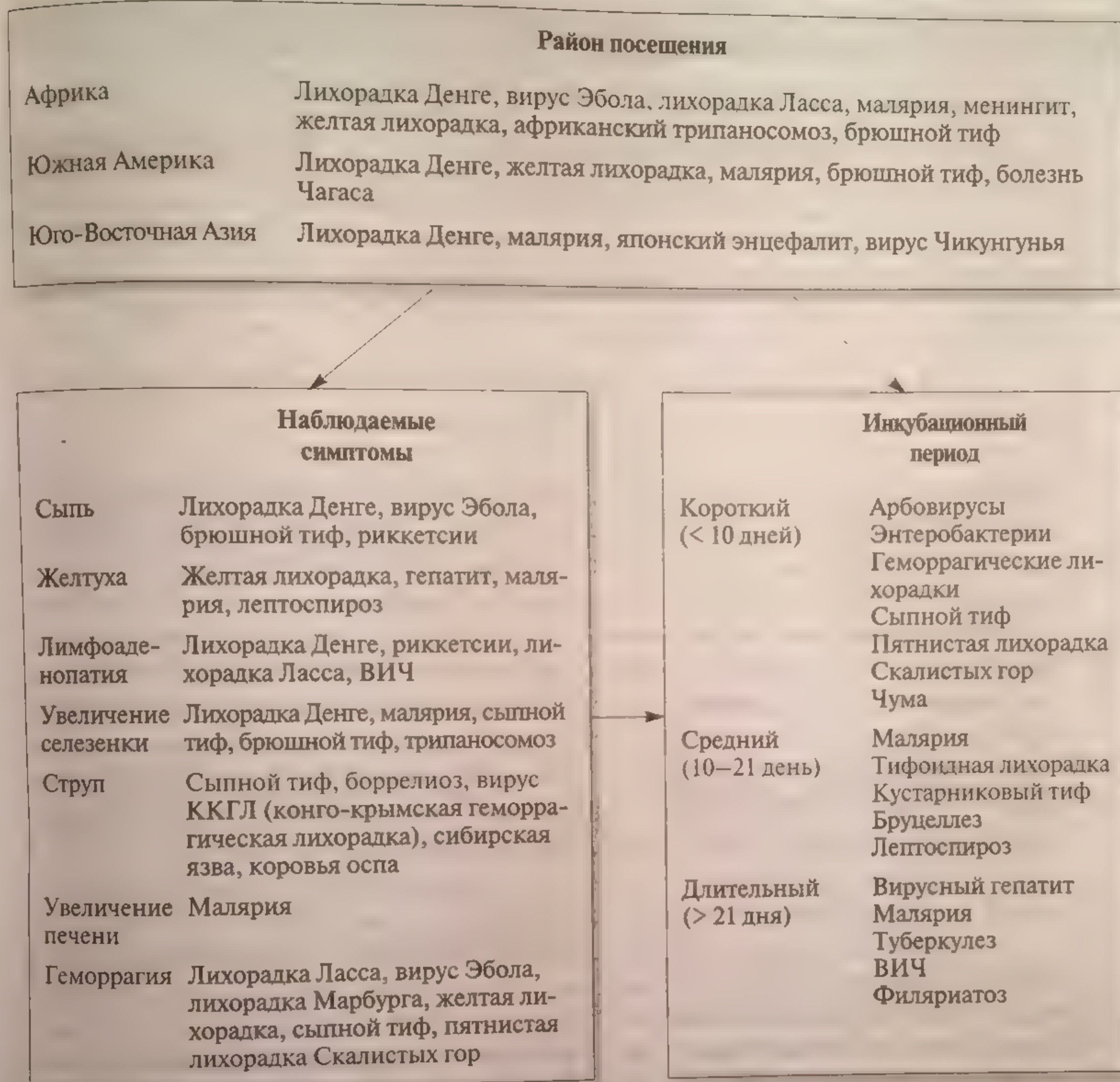


Рис. 3-2 Диагностические критерии для идентификации «экзотических» болезней. Следует отметить, что гораздо более важна точная информация о посещении конкретных стран, чем географического региона в целом.

поездок пациента и проявляемых симптомов можно сузить круг потенциальных возбудителей инфекции (рис. 3-2).

В клинические микробиологические лаборатории на анализ предоставляются образцы различных биологических проб: кровь, моча, фекалии, мокрота, биоткани и др. Обычно предъявляемые требования к результатам анализа: идентификация любых присутствующих возбудителей инфекции, и, по возможности, указание их чувствительности к антибиотикам. Если необходимо только подтвердить клинический диагноз, то в таком случае проводится относительно небольшое количество тестов без применения молекулярных методов. Если не существует никаких предположений относительно возможного возбудителя, то проводится более

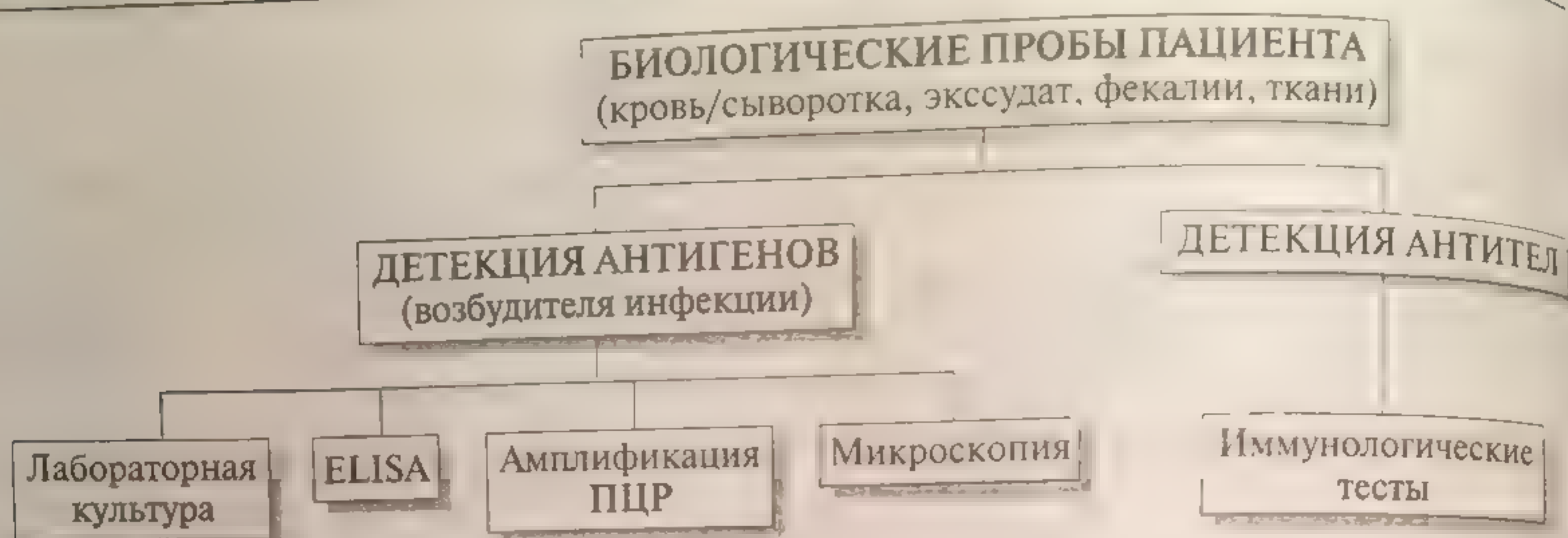


Рис. 3-3 Типы лабораторных тестов, проводимых для идентификации «экзотических» болезней.

широкий набор тестов (рис. 3-3), особенно если пациент серьезно болен. Такое же детальное исследование проводят, если подозревают высокоинфекционные формы, например оспа, чума, сибирская язва; такие анализы проводят в специальных условиях высокой изоляции.

Обнаружение в образце сыворотки крови антител к патогену — хороший индикатор недавнего инфицирования искомым микроорганизмом, особенно если титр антител растет. Существует два метода обнаружения антител. В первом из них исследуется образование иммунопреципитатов при смешивании тестируемого образца с подходящим антигеном. Во втором — антиген иммобилизуют на твердой поверхности и затем обрабатывают анализируемой сывороткой. После отмывания от несвязанного белка присутствие антитела, связанного с антигеном, определяется добавлением флуоресцентно-меченного антитела к иммуноглобулину человека.

Классические методы определения антигенов — это культивирование возбудителя инфекции, микроскопия влажных и прокрашенных образцов и детекция антигенов специфических патогенов методом ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, или ТФИФА — твердофазный иммуноферментный анализ) или другими иммунологическими методами. Молекулярные методы, такие как ПЦР, обычно не используются, если только инфекция не угрожает жизни или не распространяется слишком быстро. Этому есть две причины. Первая: ПЦР — очень чувствительный метод, и существует риск амплификации очень небольших количеств неспецифичной ДНК. Следовательно, в любой лаборатории при повседневном использовании этого метода необходимо соблюдать осторожность, иначе возможны неправильные диагнозы. Во-вторых, ПЦР идеально подходит для получения ответов типа «да/нет», например присутствует в образце *Bacillus anthracis* (сибирская язва) или нет. Гораздо меньше этот метод пригоден для определения, какой организм из множества других присутствует в образце. Причина этого в том, что ПЦР лучше всего работает, когда только одна или небольшое число пар праймеров используются в тестовой реакции. Если в одной реакции используется большое число пар праймеров, соответствующих всем возможным возбудителям инфекции, то возникает серьезная проблема возможных артефактов. Из всего сказан-

Дополнение 3-2. Молекулярная эпидемиология в судебно-медицинской экспертизе

Многие люди знакомы с широко распространенным в настоящее время использованием ДНК-фингерпринтинга для идентификации насильников и других преступников. Интересно, что аналогичным образом анализ ДНК-полиморфизмов в микроорганизмах используется для установления источника, взаимосвязей и путей передачи конкретного изолята, особенно, если это связано со злым умыслом (микробная судебная медицина).

Один из первых случаев использования микробной судебной медицины — исследование предположения, что ряд пациентов во Флориде заразились ВИЧ при посещении дантиста. Подтверждение этому было получено в результате сравнения последовательностей амплифицированных фрагментов (нуклеиновых кислот) вирусов, обнаруженных у пациентов и дантиста. Дру-

гой заслуживающий внимания пример — исследование полиморфизмов в геноме спор *Bacillus anthracis*, распыленных в Японии в 1993 г. сектой Аум Сенрике. Мультилокусный анализ вариабельных тандемных повторов показал, что штамм, использованный для атаки биотеррористами, был штаммом Sterne 34F2, который применяется в Японии для профилактики заболевания животных сибирской язвой. В противоположность этому приведем другой пример: молекулярные исследования вируса, вызвавшего вспышку лихорадки Западного Нила в США в 1999 г., показали наличие одного и того же штамма у птиц и у людей, проживающих в Нью-Йорке. Этот штамм обладал большим сходством с изолятом, обнаруженным у мертвого гуся в Израиле, в результате чего был сделан вывод, что вирус природного происхождения.

ного ясно, что молекулярные методы имеют ограниченное применение в повседневной диагностике, но это весьма ценный инструмент для судебно-медицинских экспертиз (дополнение 3-2) и в случае эпидемий.

Молекулярная эпидемиология

Микробиологи-эпидемиологи проводят мониторинг распространения микроорганизмов, в основном бактерий и вирусов, связанных с инфекционными болезнями людей или животных, на всех уровнях, начиная от единственного хозяина или экосистемы (например, госпиталь) до окружающей среды в мировом масштабе. На основании эпидемиологических исследований могут быть определены риски, а также приняты меры, направленные на предотвращение процесса распространения болезни, и оценена их эффективность. Фундаментальный принцип эпидемиологии состоит в том, что все штаммы, выделенные во время вспышки заболевания, должны обладать рядом определенных признаков, которые отличают их от тех изолятов (культур микроорганизмов) или штаммов, которые не причастны к вспышке заболевания. Эти признаки определяются типированием и могут быть фенотипическими или генотипическими. Классически бактериальные штаммы характеризуют фенотипическими методами с использованием маркеров, таких как способность сбрасывать различные сахара, присутствие или отсутствие конкретных ферментов, чувствительность к ряду бактериофагов и данные электрофоретического разделения в полиакриламидном геле (ПААГ). В настоящее время

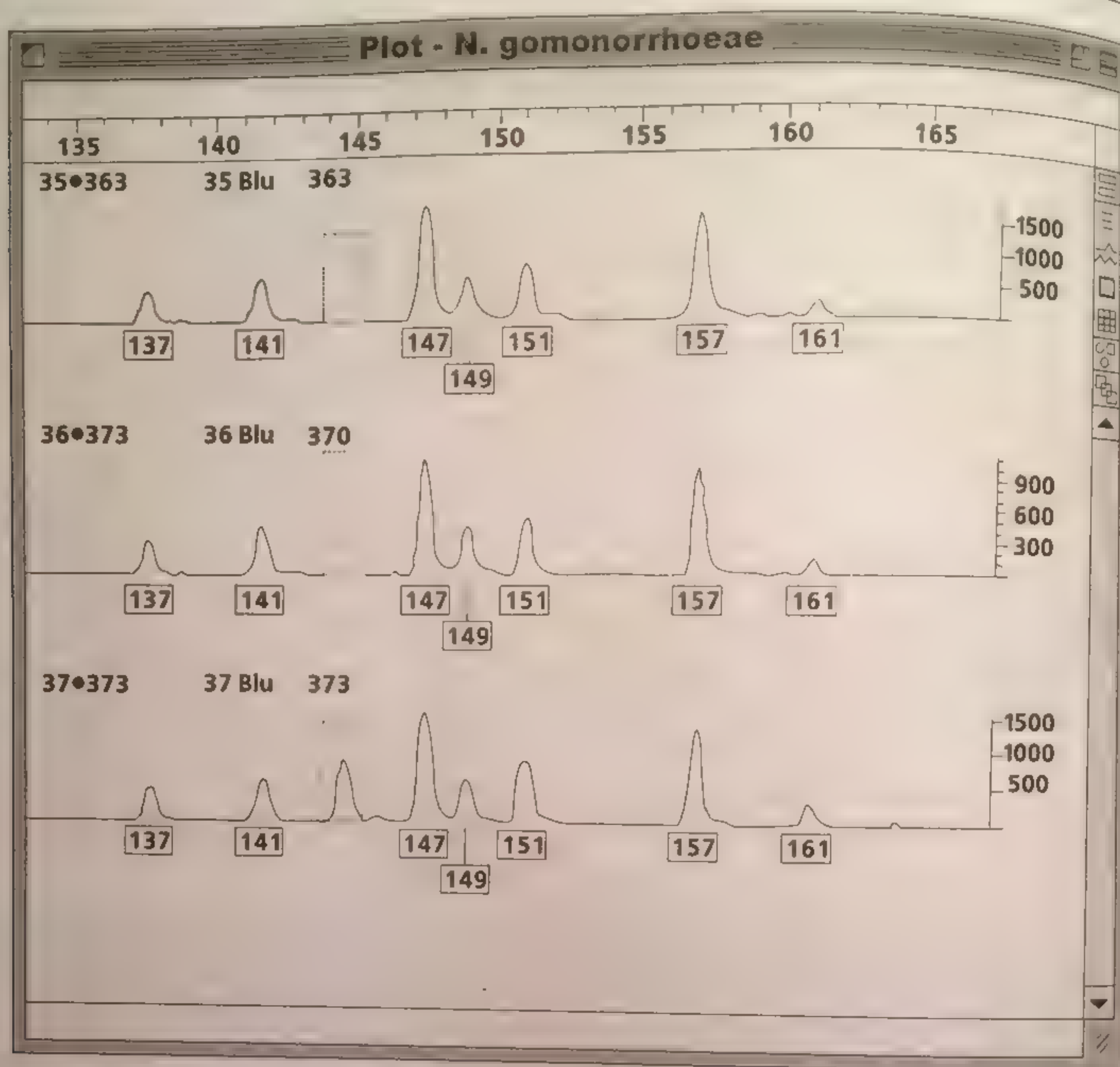


Рис. 3-4 Профили разделения, полученные при флуоресцентном анализе AFLP изолятов *Neisseria gonorrhoeae*. Показано окно размером в 30 пар нуклеотидов (135–165 п. н.). Цифры в рамках под флуоресцентными пиками — размеры фрагментов в п. н. Шкала справа от каждого профиля показывает единицы флуоресценции. Два верхних профиля получены для изолятов эпидемиологически связанных случаев, а нижний профиль — для серологически идентичного, но не связанного с эпидемией изолята. Пик в районе 144 п. н., отмеченный на нижнем профиле, отличает этот штамм от двух других, профили которых расположены выше.

больший упор делают на методы идентификации ДНК-полиморфизмов в различных изолятах.

Много различных молекулярных методов было разработано для типирования микроорганизмов, но наиболее распространенными являются RAPD (random amplification of polymorphic DNA — случайная амплификация полиморфной ДНК), AFLP (amplified fragment length polymorphisms — полиморфизм длины амплифицированных фрагментов, ПДАФ), PFGE (pulsed field gel electrophoresis — гель-электрофорез в пульсирующем поле), риботипирование и мультилокусное секвенирование. Первые три из этих методов идентифицируют полиморфизмы во всем геноме, в то время как последние два сфокусированы на небольших группах генов. Оба метода, RAPD и AFLP, включают расщепление ДНК эндонуклеазой рестрикции, амплификацию выбранных фрагментов с помощью ПЦР и

разделение фрагментов электрофорезом в геле. Одинаковые картины должны наблюдаться для идентичных изолятов, отличающиеся — для неродственных штаммов одного и того же организма (рис. 3-4). Сами методы сильно различаются в деталях, и достаточно сказать, что метод AFPL дает гораздо более воспроизводимые результаты, чем метод RAPD. В случае метода PFGE геномную ДНК расщепляют эндонуклеазой рестрикции, а фрагменты разделяют пульс-электрофорезом в полиакриламидном геле. При риботипировании детальный анализ генома осуществляется в области генов 16S и 23S рРНК и спейсерного района между ними. При мультилокусном секвенсном типировании внутренние фрагменты ряда ключевых для жизни клетки генов (генов «домашнего хозяйства») амплифицируют и секвенируют, а затем проводят сравнение последовательностей из различных изолятов. Благодаря большим возможностям этих методов (при выявлении различий) они используются в судебно-медицинской практике с целью выявления преступной халатности и для установления связей между вспышками болезней и возможным биотерроризмом (дополнение 3-2).

Устойчивость организма-хозяина к инфекции

Не все индивидуумы одинаково чувствительны к заражению микробными патогенами. Точнее, тяжесть протекания болезни в значительной мере зависит от генотипа хозяина. Например, индивидуумы, которые гетерозиготны по мутантным аллелям, вызывающим талассемию и серповидноклеточную анемию, гораздо более устойчивы к действию малярийного паразита. Другой пример влияния хозяйского генотипа: обнаружено, что определенные аллели гена, кодирующего хемокиновый рецептор CCR5, защищают от ВИЧ-инфекции.

В настоящее время идентифицировано множество различных генов человека, которые имеют определенные аллели, обеспечивающие чувствительность или устойчивость к патогенам, например семейство генов HLA (см. с. 140). Из этого следует, что восприимчивость к инфекциям — это полигенное свойство и требует особого изучения с использованием специальных методов, описываемых в гл. 4.

Понятие бактериальной патогенности

Бактерии используют множество биохимических механизмов, чтобы занять свою нишу на поверхности или внутри хозяина, колонизировать это новое местообитание, избежать защитной реакции хозяина и исключить конкуренцию со стороны других организмов. Многие из этих факторов вирулентности и их регуляторных элементов могут быть подразделены на группы на основании сохранения сходства механизмов. Общие

принципы бактериальной вирулентности не ограничиваются только патогенами человека и теплокровных животных; они также присущи растительным патогенам и бактериям рода *Rizobium*, которые живут в симбиозе с растениями.

За исключением нескольких бактерий, синтезирующих токсины в отсутствие эукариотических клеток (например, *Clostridium botulinum*), существенным необходимым условием патогенности является контакт между бактерией и местом инфицирования. Бактерии обладают специализированными факторами, необходимыми для прикрепления к хозяину, которые представляют собой либо пили типа IV (фимбрии), либо нефимбриальные адгезины. Выявлено лишь несколько типов основных структур этих молекул. Существует значительное сходство в последовательностях между нефимбриальными адгезинами бактерий *Hemophilus* и *Moraxella* (человеческие патогены) и адгезинами растительного патогена *Xylella*. Аналогично пили типа IV бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, рода *Neisseria*, *Vibrio cholerae*, рода *Moraxella* и энтеробактерий *E. coli* имеют общие структурные и генетические особенности. Например, субъединицы пилина имеют консервативную необычную N-концевую последовательность, которая не имеет классического лидерного участка и которая удаляется специфической лидерной пептидазой. Некоторые из указанных молекул имеют метилированные N-концы и обычно содержат пары цистеинов, участвующих в образовании межцепочечных дисульфидных связей вблизи C-конца.

Некоторые бактерии способны проникать внутрь клеток хозяев и реплицироваться. Для этого нужны специальные детерминанты, называемые факторами инвазии. Эти факторы часто разрушают сигнальные системы хозяина, вызывая тем самым поглощение (интернализацию) бактерии клетками, не способными в норме к фагоцитозу, т. е. эпителиальными клетками. Два механизма интернализации были открыты, и оба включают структурную мимикрию. Один из этих механизмов включает продукцию гомологов хозяйских белков патогенами. Например, бактерии родов *Yersinia* и *Salmonella* продуцируют тирозинфосфатазы, обнаруживающие значительную сиквенсную и структурную гомологию с эукариотическими фосфатазами. Поскольку в бактериях обычно не происходит фосфорилирования тирозина, весьма вероятно, что эти молекулы возникли в процессе эволюции специально, чтобы участвовать в модуляции клеточных функций. Второй механизм включает эффекторы, которые не имеют очевидного сходства с аминокислотными последовательностями клеточных белков, но обнаруживают сходство с последними на уровне трехмерных структур. Этот тип мимикрии чрезвычайно характерен для кишечных патогенов, а также для родов *Listeria*, *Helicobacter* и *Pseudomonas*.

Часть патогенного процесса включает уклонение от разрушения защитными системами хозяина. В некоторых случаях это достигается путем приспособления к условиям жизни в клетке, в то время как в других случаях бактерия синтезирует внеклеточные полисахариды, которые являются слабыми иммуногенами и обладают антифагоцитарными свойствами.

Если бактерии не могут избежать атаки молекулами иммуноглобулинов, тогда они могут синтезировать специфические ферменты для разрушения последних. Если фагоцитирующая клетка поглощает патоген, то он может синтезировать защитные факторы, чтобы выжить в условиях окислительного стресса, низкого pH, действия антимикробных защитных пептидов.

Токсины — наиболее известные бактериальные факторы вирулентности. В некоторых случаях они продуцируются, чтобы помочь патогену разрушить мембрану фагоцитирующей вакуоли и попасть в цитоплазму хозяина. В других случаях неинвазивный патоген может использовать свои токсины, чтобы влиять на освобождение питательных веществ из хозяина. Опять же существует общность механизмов. В случае грамотрицательных патогенов растений и животных эти токсины доставляются в клетки хозяина с помощью пилей типа IV, описанных ранее, или белковым комплексом системы секреции III типа. Из 20 белков, участвующих в системе секреции типа III, по крайней мере, девять сохраняются в различных бактериальных штаммах и, по-видимому, представляют собой «коровые» (основные) компоненты аппарата секреции. Точно так же существует лишь несколько типов токсинов, несмотря на большое число различных мишеней хозяев. Широким набором грамотрицательных бактерий продуцируется семейство токсинов RTX (repeats in toxins). Эти токсины делятся на две категории: гемолизины, которые влияют на разнообразные типы клеток, и лейкотоксины, которые гораздо более специфичны к клеткам и организмам. Характеристики этих токсинов и соответствующих генов приведены в табл. 3-4. Другие факторы вирулентности, которые легко выявляются во время осуществления проектов по секвенированию геномов, — это белки, участвующие в связывании железа и синтезе антибиотиков. Железо существенно для вирулентности, но никогда не бывает свободным в цитоплазме или внеклеточном матриксе. В случае антибиотиков функция факторов, по-видимому, заключается в подавлении других бактерий, которые могут конкурировать за питательные вещества, выделяемые в результате разрушения клетки хозяина.

Таблица 3-4 Генетические свойства семейства токсинов RTX

Особенность	Свойства
Структура оперона	Четыре гена, обозначенные в порядке транскрипции <i>rtxC</i> , <i>rtxA</i> , <i>rtxB</i> , <i>rtxD</i>
Структура белка	Токсин — продукт гена <i>rtxA</i> и содержит тандемно повторяющийся нона-пептид с консенсусной последовательностью GGXGXDX[L/I/V/W/Y/F]X, где X — любая аминокислота. Этот пептид повторяется 6–40 раз
Посттрансляционная модификация	Токсины семейства RTX требуют посттрансляционной модификации, чтобы стать биологически активными, и это достигается ацилированием продукта гена <i>rtxA</i> продуктом гена <i>rtxC</i>
Секреция	Токсины семейства RTX не имеют канонических сигнальных последовательностей, но секретируются с помощью продуктов генов <i>rtxB</i> и <i>D</i>

Сравнительная генетика может быть использована для узнавания детерминант вирулентности во вновь секвенированном геноме организма. Гены, имеющие существенную гомологию с хорошо охарактеризованными генами вирулентности других организмов, по-видимому, также связаны с вирулентностью. Однако следует проявлять осторожность в случае гомологии с «предполагаемым» геном вирулентности, поскольку многие из таких генов, как оказывается впоследствии, не играют никакой роли в инфекции. Другой индикатор: присутствует ли продукт гена в вирулентных штаммах, но при этом отсутствует в неvirulentных или менее вирулентных изолятах тех же штаммов. Указанием на возможную роль в вирулентности может быть наличие в продукте гена множества аминокислотных замен у различных изолятов.

Островки патогенности

Тот факт, что неродственные патогены используют очень сходные механизмы для проникновения в хозяина и что существует значительная белковая гомология для каждого типа детерминант патогенности, заставляет предположить, что существует широкий горизонтальный перенос генов вирулентности. Подтверждением этому служит обнаружение островков патогенности (PAIs) в грамположительных и грамотрицательных бактериях, геномы которых были полностью секвенированы. PAIs — большие хромосомные районы (35–200 тыс. п. н.), кодирующие несколько кластеров генов вирулентности, которые присутствуют во всех патогенных изолятах и обычно отсутствуют в непатогенных изолятах. Часто их можно узнать в последовательностях генома по тому, что в них содержание G+C отличается от такового в остальной части генома. Особый интерес вызывает наблюдение, что PAIs кодируют интегразу, фланкированы прямыми повторами и находятся в бактериальной хромосоме рядом с генами tRNA. В этом отношении PAIs напоминают умеренные бактериофаги и могли быть приобретены новыми хозяевами в результате трансдукции или через конъюгативные транспозоны. В некоторых случаях PAIs расположены в плазмидах и, по-видимому, попадают туда в результате вырезания из хромосомы и интеграции в «авирулентную» плазмиду, находящуюся в той же клетке. Примеры плазмид, несущих PAIs, были обнаружены в *Shigella*, видах *Yersinia* и *Bacillus anthracis*. Последний пример наиболее интересен, поскольку основная хромосома *B. anthracis* очень похожа на хромосомы *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Последние два организма непатогенны, хотя могут производить токсин, и оба не имеют плазмиды, несущей PAI.

Сравнительная геномика и пластичность генома

До начала реализации проектов секвенирования геномов близкородственные бактерии или даже различные штаммы одной и той же бактерии можно было сравнивать относительно грубыми методами. Напри-

мер, биохимическая характеристика (метаболические профили) и ДНК-фингерпринтирование в действительности позволяют исследовать очень малую часть всего генома. Для полного анализа необходимо секвенировать все геномные ДНК изучаемых организмов, включая плазмиды. Это возможно, и в ряде случаев было сделано, однако чрезвычайно трудоемко. Альтернативный метод — секвенировать один геном и использовать информацию, полученную для конструирования ДНК-чипа, который может быть использован для определения наличия или отсутствия генов в других родственных геномах. Для сравнения штаммов выделяют тотальную ДНК, метят флуорофором и проводят гибридизацию с микрочипом. Различные геномы можно сравнивать путем мечения образцов ДНК различными флуорофорами. Образцы ДНК смешивают и после гибридизации сравнивают интенсивности двух флуорофоров для каждого локуса, представленного на микрочипе (см. гл. 2). Недостаток этого метода заключается в том, что он может детектировать только делеции в штамме по отношению к штамму сравнения, ДНК которого использовалась для конструирования микрочипа.

Большое число сравнительных анализов было сделано либо на различных штаммах одних и тех же видов, либо на различных видах одного и того же рода бактерии (дополнение 3-3). Эти анализы показали, что существует широкая консервативность последовательностей, но при этом внутри рода или вида может быть 5–25% ДНК, уникальной для каждого изолята. Например, каждый из двух различных клинических изолятов *Helicobacter pylori* имеет 7% уникальной ДНК, а различные серовары *Salmonella* имеют 10–12% уникальной ДНК. В большинстве случаев эта уникальная ДНК разбросана по всему геному и не представлена большими блоками ДНК (за исключением случаев наличия PAIs в вирулентных штаммах в отличие от авирулентных штаммов). Сравнительный анализ штаммов особенно полезен при изучении возникновения новых заболеваний и новых фенотипов заболеваний (дополнение 3-4).

Присутствие такого большого количества уникальной ДНК в различных штаммах должно вызвать два вопроса. Первый — какова функция уникальной ДНК, а второй — как возникла эта вариабельность генома? Практически нет сомнений, что уникальная для конкретных изолятов ДНК кодирует гены, которые способствуют более эффективной колонизации изолятами занимаемой ими ниши. Например, устойчивые к ванкомицину энтерококки (VREs) широко распространены в окружающей среде и госпиталях, но только те штаммы, которые содержат ген *esp* (энтерококковый поверхностный белок), обнаружены при вспышках госпитальных инфекций. Следует отметить, что в некоторых случаях вирулентные изоляты не имеют участков ДНК, присутствующих в авирулентных штаммах. Например, энтероинвазивные штаммы *E. coli* и *Shigella* не имеют хромосомного участка, который кодирует гены *cadA* (ген лизиндекарбоксилазы) и *ompT*. Отсутствие этих генов увеличивает патогенность, поскольку кадаверин, продукт *cadA*, ингибирует активность энтеротоксина этих штаммов, а

Бацилла Кальметта–Герена (или BCG) — единственная вакцина, используемая в настоящее время для предотвращения туберкулеза (ТБ). Она была создана в начале 1900-х годов путем аттенуации вирулентного штамма *Mycobacterium bovis* в результате ряда пересевов. Ее впервые применили в 1921 г. для вакцинации новорожденного ребенка, мать которого умерла от ТБ, и он должен был жить с бабушкой, страдающей от той же болезни. До самого конца жизни этот человек не болел ТБ. В последующие 6 лет еще 969 детей были вакцинированы, и их смертность от ТБ составляла только 10% от аналогичного показателя контрольной группы. В результате в 1928 г. Лига Наций рекомендовала повсеместно использовать вакцинацию BCG.

BCG широко применяется в наше время во всем мире, но ее эффективность широко варьирует.

Одно из возможных объяснений вариации эффективности вакцины — появление генетических различий из-за многообразия условий хранения и культивирования. Начиная с 1940-х годов были замечены различия в культуральных свойствах изолятов BCG, поддерживаемых различными производителями вакцины. Геномный анализ позволил идентифицировать по крайней мере семь генетических событий, которые привели к появлению вариаций штаммов используемой в настоящее время вакцины. Эти генетические события включают делеции, дупликации и однонуклеотидный полиморфизм (рис. ДЗ-3).

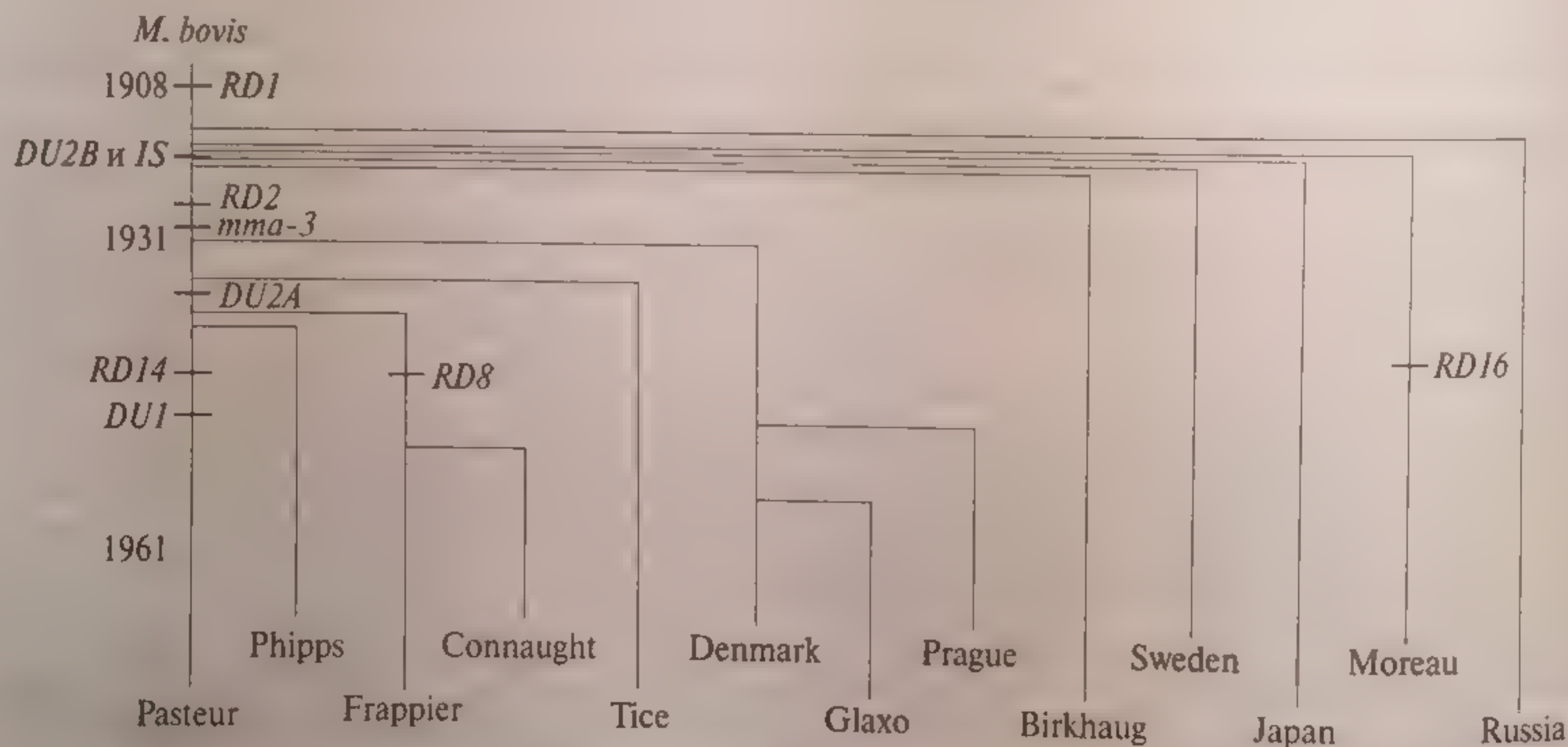


Рис. ДЗ-3 Генеалогия различных штаммов BCG. Вдоль вертикальной оси отмечено время, а на горизонтальной оси указаны различные места, где культивировали штамм BCG. RD1, RD2, RD8, RD14 и RD16 — различные делеции в геноме. IS означает потерю последовательности IS6110, а DU1, DU2A и DU2B — три различных геномных дупликации. Однонуклеотидная замена, обозначенная mma-3, препятствует синтезу метоксимиколовых кислот (данные взяты из Behr и соавт., 1999).

кодируемая *ompT* протеаза действует на белок VirG, необходимый для внутриклеточного распространения.

Анализ секвенированных геномов показал, что основная хромосомная ДНК большинства из них насыщена умеренными фагами, транспозонами, инсерционными последовательностями и короткими

устойчивого штамма *Staphylococcus aureus* (метициллин-устойчивый штамм MRSA) и синдром токсического шока

Первое сообщение о штаммах MRSA появилось в 1961 г. сразу после того, как метициллин был введен в клиническую практику. Были выдвинуты две совершенно разные гипотезы, объясняющие происхождение штаммов MRSA. Наличие гена *mecA* (пенициллинсвязывающего белка) в различных штаммах рода *S. aureus*, а также данные, указывающие на возможность горизонтального переноса в лабораторных условиях гена *mec*, позволяют выдвинуть гипотезу, что MRSA возникал независимо много раз. Данные, полученные в результате исследования MRSA методом ПДРФ (RFLP) с использованием зондов, комплементарных гену *mecA*, напротив, говорят в пользу того, что чувствительный штамм *S. aureus* приобрел ген *mecA*, получился MRSA, а затем произошли генетические изменения. Сравнительный анализ геномов показал, что штаммы *S. aureus* превращаются в MRSA, когда они получают большой (21–67 тыс. п. н.) генетический элемент, известный как «стафилококковая хромосомная кассета» *mec* (SCC*mec*). Этот уникальный генетический элемент не содержит ни фаговых генов, ни генов транспозаз. В то же время он кодирует две рекомбиназы, которые способствуют интеграции и вырезанию элемента в определенных районах хромосомы. Три различных типа SCC*mec* были идентифицированы в штаммах MRSA, а два других — в *S. hemolyticus* и *S. hominis*. Это сильный аргумент в пользу того, что штаммы MRSA появлялись многократно и независимо путем латерального переноса гена *mecA* в чувствительные предшественники.

В 1970-х годах возникла связанная с урогенитальными инфекциями эпидемия синдрома токсического шока (TSS) у женщин, пользующихся новым типом тампонов. Это вызвало дискуссии относительно того, была ли эпидемия вызвана изменением в окружающей среде (тампон) или быстрым географическим распространением нового гипервирулентного штамма. Был предпринят сравнительный анализ геномов ряда TSS-штаммов *S. aureus*, взятых выборочно из различных частей света и дающих одинаковые картины при мультилокусном энзимном электрофорезе. Геномный анализ показал, что несмотря на наличие у всех этих штаммов общего предка, они, тем не менее, генетически не идентичны, и последний из предшественников не очень близок к настоящему времени на шкале эволюции. Эти данные указывают на то, что эпидемия была вызвана изменением в окружающей среде (новым тампоном), а не быстрым межконтинентальным распространением нового гипервирулентного штамма (TSS).

В противоположность описанным выше исследованиям, сравнительный анализ геномов штаммов *Streptococcus* группы A серотипа M18, ассоциированных с наблюдавшейся в течение 13 лет острой ревматической лихорадкой в центральной и западной части США, показал, что штаммы являются практически генетически идентичными. Поскольку изоляты содержали многочисленные мобильные генетические элементы, то это наблюдение позволяет предположить, что они имели генетическую конфигурацию, оптимальную для индукции ревматической лихорадки у человека.

повторяющимися последовательностями ДНК. Кроме того, многие штаммы несут одну или более плазмид. В целом эти элементы могут способствовать обмену генами и их перестройке путем трансформации, трансдукции, конъюгации и гомологичной или «незаконной» рекомбинации, обеспечивая таким образом наблюдаемую пластичность генома.

Борьба с инфекционными заболеваниями

Обычный путь лечения бактериальных и грибковых заболеваний — применение антибиотиков. Хорошо известно, что некоторые микробы быстро приобретают устойчивость к используемым на данный момент антибиотикам, и это значит, что существует постоянная потребность в новых антибиотиках. Удивительно, что устойчивость некоторых клинических изолятов была обнаружена даже к недавно (в течение последних 25 лет) введенным в клиническую практику оксазолидинонам, относящимся к новому классу антибиотиков. Традиционным путем получения новых антибиотиков является скрининг природных изолятов микробов, но более предпочтительный в настоящее время подход — идентификация новых клеточных мишеней и скрининг химических библиотек в поисках веществ с ингибиторными свойствами. Как будет показано далее, геномика способствует разработке методов для идентификации ключевых генов, участвующих в патогенезе, которые могут служить подходящими мишенями для новых антибиотиков.

В то время как антибиотики используются для лечения инфекций, вакцины предназначены в первую очередь для предотвращения инфекций. Эффективная вакцина против бактериального патогена обеспечит защиту независимо от наличия у бактерии устойчивости к антибиотикам, и это демонстрирует преимущества предупреждения болезни по сравнению с ее лечением. Вакцина работает путем создания гуморального и/или клеточного иммунитета, который предотвращает развитие болезни при воздействии соответствующего патогена. Это достигается путем предоставления иммунной системе подходящих антигенных детерминант, имитирующих каким-либо образом природные инфекции. Обычные вирусные вакцины состоят из инактивированных, вирулентных штаммов или живых аттенуированных штаммов, но при этом существуют некоторые проблемы. Например, многие вирусы не способны расти до высокого титра в культуре тканей (например, вирус гепатита В). Кроме того, существует опасность индуцируемого вакциной заболевания, если используется инактивированный вирус, поскольку в прививке может остаться способный к репликации вирус. Наконец, аттенуированные вирусные штаммы потенциально могут возвращать вирулентный фенотип при репликации в вакцинируемом организме. Таких случаев наблюдается 1–2 на каждый миллион людей, получающих полио-вакцину. Для создания вакцин-кандидатов, не имеющих указанных проблем, широко используются методы геномики и генной инженерии.

Новые подходы к вакцинированию

Рассмотрение альтернативных подходов к разработке живых вакцин следует начать с организма *Salmonella typhimurium*, вызывающего пищевые отравления. Этот организм может быть аттенуирован путем введения нарушений в гены *aro*, кодирующие биосинтез ароматических аминокислот. В то время как дозы 10^4 *Salmonella typhimurium* дикого типа воспроизводи-

мо убивают мышей, *aro*-мутанты не способны на это даже в дозах, в миллион раз превышающих указанные выше. Однако мутантные штаммы способны вызывать самолимитирующиеся инфекции у мышей и могут быть обнаружены в небольших количествах в таких органах, как печень и селезенка. Такие аттенуированные штаммы *Salmonella typhimurium* могут выступать в роли носителей гетерологичных антигенов, поскольку могут доставляться пероральным путем и стимулировать гуморальный, секреторный и клеточный иммунные ответы. Другой исследованный аттенуированный хозяин — вакцинный штамм *Mycobacterium bovis* бациллы Кальметта—Герена (BCG).

Еще один метод аттенуирования бактериального патогена для использования в качестве вакцины был продемонстрирован на примере *Vibrio cholera*. Энтеротоксин, продуцируемый этим организмом, имеет две субъединицы: А и В. Методами генной инженерии домен А1 субъединицы А был deletирован. Результирующий штамм продуцирует иммуногенную В-субъединицу холерного токсина, но не способен продуцировать необходимую А-субъединицу и, как было показано во время клинических испытаний, является безопасным и иммуногенным. Без сомнения, секвенирование полных геномов позволит идентифицировать другие гены, которые можно deletировать в патогенах с целью создания аттенуированных штаммов, не способных ревертировать (к исходному состоянию).

Секвенирование геномов стимулировало еще один подход к разработке вакцин, который можно продемонстрировать на примере менингококков группы В. Экспонированные на поверхности этих бактерий белки проявляют широкую вариабельность, что затрудняет выбор кандидатов для вакцин. Анализ последовательности менингококкового генома позволил идентифицировать более 500 белков как потенциальных протективных антигенов. Гены более 350 таких антигенов были клонированы в *E. coli*, антигены экспрессированы и очищены, а затем использованы для иммунизации мышей. Сыворотка, полученная от этих мышей, позволила идентифицировать белки, которые экспонированы на поверхности менингококка, консервативны для широкого набора штаммов и способны индуцировать синтез бактерицидных антител (вызывают иммунный ответ).

Рекомбинантные вирусы также могут быть использованы в качестве векторов для экспрессии гетерологичных антигенов и являются, таким образом, живыми вакцинами (табл. 3-5). Первый вирус животных,

Таблица 3-5 Некоторые экспрессируемые рекомбинантными вирусами коровой оспы гетерологичные антигены, которые стимулируют выработку нейтрализующих антител и клеточного иммунитета и обеспечивают защиту животного

Гликопротеин вируса бешенства	Поверхностный антиген вируса гепатита В
Гликопротеин везикулярного стоматита	Гемагглютинин вируса гриппа
Гликопротеин D вируса простого герпеса	Белок оболочки ВИЧ

использованный для таких целей, — коровья оспа, который ранее применялся как нерекомбинантная вакцина, обеспечивающая одновременно защиту от натуральной оспы. Вирус коровьей оспы — особенно привлекателен в качестве переносчика вакцин, поскольку очень устойчив к лиофилизации, его производство дешево и он легко вводится через царапину на коже пациента. Наиболее успешно проведенная к настоящему времени кампания по вакцинации с применением рекомбинантного вируса включала использование рекомбинантного вируса коровьей оспы, экспрессирующего гликопротеин вируса бешенства. Вакциной иммунизировали популяцию диких лис в Центральной Европе путем разбрасывания приманок с вирусом. Эпидемиологический эффект был поразительный. После трех кампаний по вакцинации вспышка бешенства, наблюдавшаяся в Швейцарии в течение двадцати лет, внезапно закончилась, и болезнь почти исчезла в Бельгии. Хотя вирус коровьей оспы может быть легко превращен в новые вакцины-кандидаты, он обладает тем недостатком, что порождает неприемлемо высокий риск неблагоприятных реакций. По этой причине в качестве векторов начали разрабатывать другие классы вирусов, такие как аденовирус и альфавирус.

Несмотря на описанные выше успехи в создании рекомбинантных вакцин, лишь некоторые из них разрешены к применению на людях. Одна из таких рекомбинантных вакцин, нашедшая наиболее широкое применение, обеспечивает защиту от вируса гепатита В. Она состоит из поверхностного антигена вируса гепатита В, который экспрессируется в дрожжах и образует вирусоподобные частицы. Поскольку ни дрожжи, ни вирусоподобные частицы не могут реплицироваться в человеческом организме, вакцина является слабым иммуногеном. Тем не менее анализ затрат и выгод (анализ всех «за» и «против») позволяет сделать вывод, что вакцинировать против гепатита В тех, кто подвержен риску оказаться в контакте с больными, выгодно. Чрезвычайно возросшая опасность биотерроризма после событий 11 сентября 2001 г. заставляет заново пересмотреть вопрос о разработке и использовании рекомбинантных вакцин. Смерть небольшого числа индивидуумов в результате неблагоприятных (аллергических) реакций на вирусную вакцину безусловно предпочтительней, чем широкомасштабное заражение населения высокоинфекционными патогенами, способными вызывать летальный исход!

Иммунная система вырабатывает антитела в ответ на узнавание белков и других макромолекул, находящихся в патогенах. В приведенных выше примерах функциональным компонентом вакцины, вводимой в хозяйский организм, является вызывающий иммунный ответ белок. Введение ДНК в организм животных не вызывает иммунного ответа. Но если при экспрессии ДНК образуется новый для организма хозяина белок, то он может стимулировать иммунную систему. Это принцип ДНК-вакцинации (см. также с. 244). ДНК-вакцины обычно представляют собой бактериальную плазмиду, несущую некий ген. Ген кодирует подходящий антиген и работает под контролем сильного промотора, который узнается клеткой хозяина. Метод обладает следующими преимуществами: простота, широ-

кий диапазон применения, возможность легко получать вакцину в большом количестве, а также возможности использования последовательностей ДНК бактерий, о которых известно, что они способны стимулировать иммунную систему, и возможность лечения болезней, которые уже получили «статус» хронических инфекций.

Геномика и разработка новых антибактериальных препаратов

Устойчивость микробов к антибиотикам — основная проблема общественного здравоохранения. Существует два типа устойчивости: приобретенная и природная. Приобретенная устойчивость возникает в результате мутации или приобретения плазмиды с генами, кодирующими ферменты, которые модифицируют антибиотики и делают их неэффективными. Природная устойчивость закодирована в хромосоме, и наиболее распространенная форма — наличие множества генов для работы системы выведения антибиотика. Секвенирование всего генома показало, что такие системы широко распространены в бактериях, и внутри одного изолята организма может существовать полный набор систем выброса (рис. 3-5). Из-за широкого распространения этих систем некоторые фармацевтические компании инициировали программы поиска соответствующих ингибиторов.

При обсуждении клеточных функций, которые могли бы служить мишенями для антибиотиков, следует иметь в виду результаты геномного анализа, который показал, что микробные гены можно разделить на четыре типа:

- 1) консервативные гены, присутствующие в большинстве живущих организмов;
- 2) гены, консервативные внутри определенного филогенетического царства;
- 3) гены, консервативные в пределах отряда или семейства;
- 4) гены, специфичные для конкретного организма.

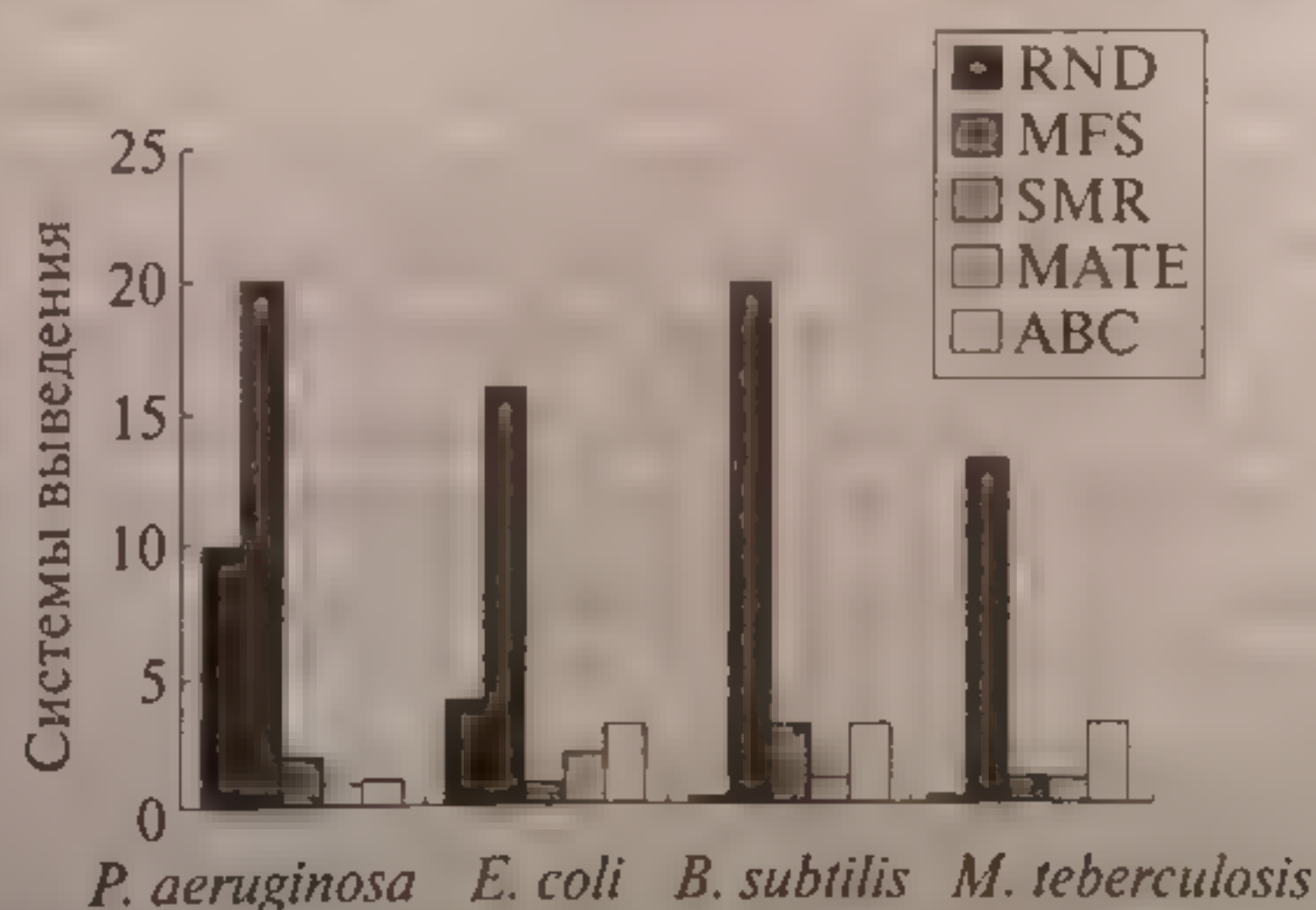


Рис. 3-5 Сравнение ряда предсказанных систем выброса в различных бактериях. ABC — семейство АТФ-связывающих кассет; MATE — семейство выведения многих лекарств и токсических веществ; MFS — семейство главного помощника; RND — семейство белков резистентности у клубеньковых растений; SMR — малое семейство устойчивости ко многим лекарствам.

Продукты генов первого типа не представляют интереса как мишени для антибиотиков, в то время как другие три типа обеспечивают нужный уровень селективности. Анализ геномных последовательностей показывает, что около 25% бактериальных генов необходимы для роста на богатой питательной среде. Из них 40% не имеют аналогов в организмах млекопитающих, и продукты их генов — потенциальные мишени для новых антибиотиков. Если они присутствуют в большинстве бактерий, то могут быть использованы для подбора антибиотиков широкого спектра действия. В противном случае они могут быть мишенями для антибиотиков с более узким спектром действия. Для обеспечения максимальной специфичности можно выбрать в качестве объекта важнейший (существенный) путь или белок, который присутствует лишь в очень ограниченной группе бактерий. Примерами таковых служат ферменты, участвующие в липогенезе и липолизе, а также новые богатые глицином белки, обнаруженные в *Mycobacterium tuberculosis*. Преимущество последнего подхода состоит в том, что если подходящий антибиотик идентифицирован, его использование следует ограничить небольшим числом клинических показаний, что минимизирует случаи неправильного применения и связанное с этим развитие устойчивости.

Один из недостатков большинства антибиотиков заключается в том, что они убивают как вредные, так и полезные бактерии. Яркий пример тому — гибель микрофлоры кишечника в результате применения антибиотиков широкого спектра действия, которая может сопровождаться нежелательной грибковой колонизацией. Поскольку антибиотики оказывают бактерицидное действие, существует очень сильное селективное давление на выработку устойчивости к антибиотикам. Альтернативным подходом может быть выбор в качестве мишеней белков, которые необходимы для вирулентности, но не для роста. Это дало бы дополнительное преимущество, заключающееся в меньшей вероятности существования у организмов млекопитающих мишеней-аналогов. Следовательно, риск возникновения проблем токсичности был бы гораздо ниже. Как обсуждалось ранее, в бактериях имеется много различных детерминант вирулентности: токсины, адгезины, инвазины и др. Однако, вероятно, существует еще больше генов, которые существенны для вирулентности и могут служить хорошими мишенями при антибиотикотерапии. Ряд различных подходов был использован для идентификации этих детерминант вирулентности. Ниже будут подробнее обсуждены три из них: технология экспрессии *in vivo*, индукция дифференциальной флуоресценции и мутагенез методом мечения маркером (signature-tagged mutagenesis).

Технология экспрессии *in vivo*

Технология экспрессии *in vivo* (IVET) была разработана для позитивной селекции генов, специфически индуцирующихся в микроорганизме при инфицировании организма животного или растения. Основа системы — плазида, несущая беспромоторный оперон *lacYZ*, слитый с генами *purA* и *thyA* и расположенный вблизи уникального сайта для клониро-

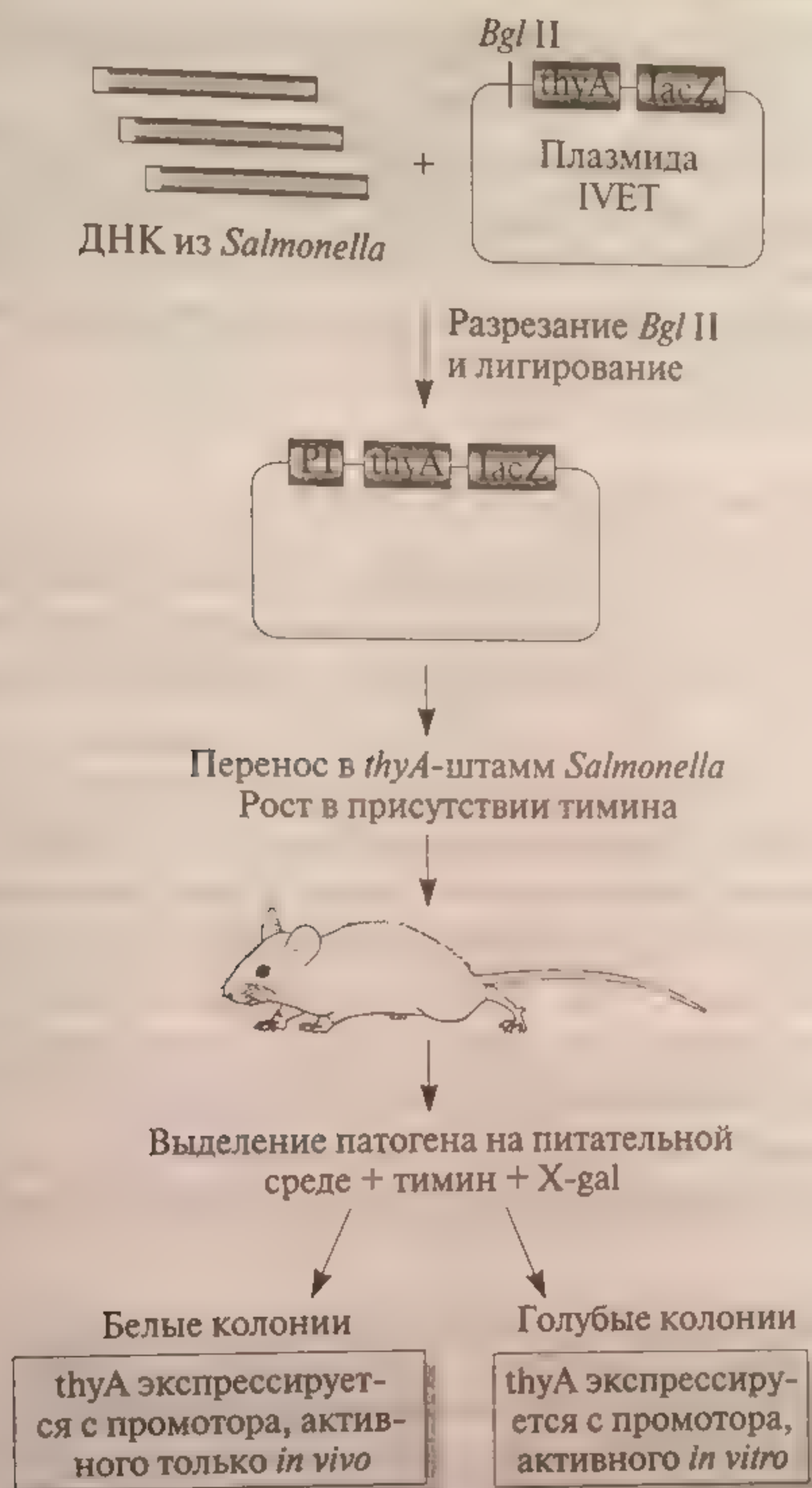


Рис. 3-6 Основной принцип IVET. См. подробности в тексте.

вания *Bgl* II (рис. 3-6). Это слияние оперонов было осуществлено в векторе-самоубийце. Встраивание конструкции в ДНК патогена по сайту *Bgl* II приводит к получению пула (набора) транскрипционных слияний, направляемых промоторами, присутствующими в клонируемой ДНК. Такой набор слияний переносится в штамм патогена, у которого делетированы *purA* или *thyA* и селекция производится по их интеграции в хромосому. Рекомбинантный патоген затем используется для инфицирования подопытного животного. Слияния, которые содержат промотор, активный в организме животного, обеспечивают транскрипцию гена *purA* или *thyA* и, следовательно, выживание бактерий. После выделения выживших патогенов из подопытного животного проводится анализ уровня экспрессии *in vitro* β -галактозидазы. Клоны, содержащие слияния с генами, которые специфически индуцируются в организме животного, обнаруживают слабую экспрессию *lacZ* в лабораторных средах. Секвенирова-

нием ДНК осуществляют идентификацию этих генов, которым принадлежат обнаруженные промоторы.

Система IVET первоначально разработана для изучения мышинной модели брюшного тифа. Со времени своего первого упоминания эта система нашла применение в исследовании широкого набора грамположительных и грамотрицательных организмов, включая «трудные» организмы, такие как *Mycobacterium*.

Дифференциальная индукция флуоресценции

Это другой путь идентификации промоторов, контролируемых внешними условиями. Он был изначально разработан для облегчения идентификации генов *Salmonella*, которые дифференциально экспрессируются в макрофагах. Фрагменты ДНК из *Salmonella* встраивали рядом с лишенным промотора геном зеленого флуоресцентного белка (GFP — green fluorescent protein) и возвращали в клетки *Salmonella*, которую затем использовали для инфицирования макрофагов. Ставшие флуоресцентными клетки обнаруживали методом сортировки флуоресцирующих клеток (FACS), а затем выращивали на среде в отсутствие макрофагов. Бактерии, которые не флуоресцировали вне клеток, были отобраны и использованы для второго «раунда» инфекции макрофагов. Бактерии, все еще способные генерировать флуоресцирующие макрофаги, как оказалось, содержат слияния с GFP, которые были активированы внутриклеточной средой макрофагов.

Мутагенез методом мечения маркером

Это вариант транспозонового мутагенеза, который использовался для идентификации генов вирулентности бактерий. Основной принцип — создание с помощью транспозонов большого числа различных мутантов патогенного организма и выявление среди них тех, которые могут выживать *in vitro*, но не *in vivo*: при сканировании всего генома выявляются гены, специфичные для выживания в определенной среде. Можно было бы анализировать каждый мутант индивидуально, но это трудоемко и потребовало бы большого числа животных. С использованием мутагенеза, основанного на мечении маркером, можно анализировать большое число различных мутантов *одновременно в одном и том же животном*. Это достигается присоединением к каждому транспозоновому мутанту различных последовательностей ДНК, или маркеров.

Использование мутагенеза с «сиквенсным маркером» было впервые описано при идентификации генов вирулентности у *S. typhimurium* с использованием мышинной модели тифоидной лихорадки (рис. 3-7). «Маркеры» представляют собой различные последовательности длиной около 40 п. н. $[NK]_{20}$, где N = A, C, G или T, а K = G или T. Структура фланкирующих участков выбиралась таким образом, чтобы при амплификации «маркеров» с помощью специфических ПЦР-праймеров получались фрагменты-зонды, содержащие в 10 раз больше метки в центральном районе, а

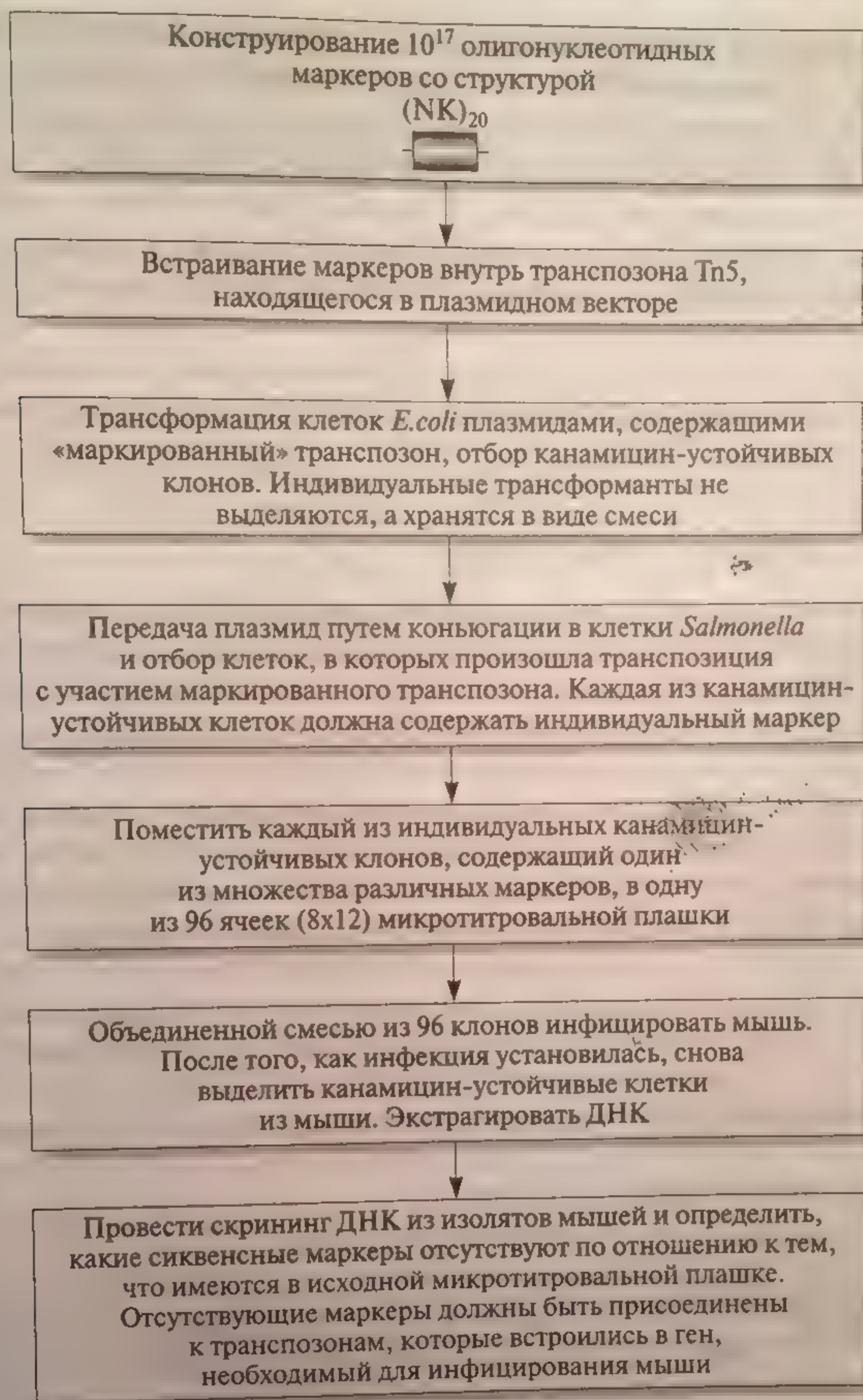


Рис. 3-7 Принцип мутагенеза методом мечения маркером.

не во фланкирующих участках. Двухжелевой маркер лигировали с транспозоном Tn5 и переносили из *E. coli* в *S. typhimurium* путем конъюгации. Библиотека, состоящая из более чем 1500 эксконъюгантов, полученных в результате транспозиции, переносилась на микротитровальные плашки. Из этих эксконъюгантов 1152 были отобраны и получены 12 смесей по 96 мутантов. Каждую из этих смесей инъецировали в брюшину одной из серии подопытных мышей и давали возможность инфекции распространиться. Затем выделяли бактерии из каждой мыши путем помещения гомогенатов

селезенки на культуральные среды. Из полученных бактерий выделяли ДНК, и с помощью ПЦР амплифицировали сиквенсные маркеры. Те последовательности, которые присутствуют в первоначальной смеси бактерий, но отсутствуют в конечных смесях, выделенных с культуральных сред, указывают на мутации в генах, существенных для вирулентности. Таким образом, были идентифицированы 28 различных мутантов с аттенуированной вирулентностью, причем некоторые из них указывали на ранее не охарактеризованные гены.

Принцип мутегенеза методом мечения маркером широко используется для анализа детерминант патогенности у разных микроорганизмов, включая бактерии и грибы.

Борьба с грибковыми инфекциями

Грибы как эукариоты гораздо ближе к человеческому организму, чем бактерии. Действительно, некоторые белковые компоненты клеток дрожжей и человека функционально взаимозаменяемы. К таким белкам относятся те, что участвуют в цикле клеточного деления, в развитии реакций на стресс, в регуляции генов, в локализации белков, в метаболизме и в синтезе АТР. Важным следствием этой близости является то, что трудно выявить существенные различия между дрожжевыми и человеческими клетками с тем, чтобы можно было бы найти хорошие мишени для противогрибковых препаратов. Тем не менее грибы используют факторы вирулентности (табл. 3-6), сходные с описанными ранее для бактерий (см. с. 97), и поэтому подходы, применяемые для борьбы с бактериальными инфекциями, также применимы при грибковых заболеваниях.

Таблица 3-6 Некоторые факторы вирулентности, найденные в грибах

Фактор вирулентности	Примеры
Продукция токсина	Глиотоксин <i>Aspergillus fumigatus</i>
Продукция клеточных адгезинов	Последовательности, сходные с агглютинином <i>Candida</i> , интегриноподобный белок и белок Hwp1, который прикрепляет клетки грибов к клеткам человека
Инвазия	Секреция гидролитических ферментов грибом <i>Candida</i> и адаптация к кислым значениям pH (вагина)
Уклонение от факторов защиты хозяина	Модуляция иммунных реакций хозяина. Переключение с мицелиальной формы на дрожжеподобную

Успехи в лечении протозойных инфекций

Как уже упоминалось выше, на разработку противопротозойных препаратов направляется очень мало усилий, несмотря на то что эти болезни относятся к наиболее распространенным в мире инфекционным заболеваниям (табл. 3-7). Только от одной малярии гибнет более

Таблица 3-7 Статистические данные Всемирной организации здравоохранения по некоторым протозойным инфекциям

Болезнь	Число случаев в мире	Число людей в группе риска
Малярия	300–500 млн	2400 млн
Лейшманиоз	12 млн	350 млн
Болезнь Чагаса (американский трипаносомоз)	18 млн	100 млн
Сонная болезнь (африканский трипаносомоз)	300–500 000	60 млн

3 млн человек в год! Отсутствие принимаемых мер иллюстрируется тем фактом, что из 1400 новых лекарств, разработанных за последние 25 лет, менее 1% предназначены для лечения протозойных инфекций. Отчасти это объясняется тем, что протозойные болезни характерны в основном для малоразвитых стран. Однако малярия была распространена в США и Европе, включая Великобританию, в конце XIX и начале XX вв., и может снова вернуться в случае глобального потепления. Другая причина бездействия — неправильные представления о биохимии паразитов. Однако значительный прогресс, достигнутый в секвенировании геномов ряда протозойных патогенов, и полученная в результате информация предоставили новые возможности для борьбы с этими болезнями.

При разработке стратегии борьбы с инфекционным заболеванием возникает вопрос выбора между предупреждением (вакцинация) и лечением (антибиотики) болезни. В случае болезней, распространенных в развитых странах первый подход, без сомнения, предпочтителен, поскольку меньшая нагрузка приходится на системы первичного звена здравоохранения. При разработке вакцин против протозойных инфекций первой «на очереди» стоит малярия. Во-первых, болезнь проходит через несколько различных стадий в человеческом организме (дополнение 3-5), и на каждой стадии паразит экспрессирует различные антигены. Таким образом, вакцина, эффективно уничтожающая паразитов на «печеночной» стадии, может не препятствовать росту паразитов, находящихся в крови. Во-вторых, индивидуальный клон паразита содержит около 50 различных копий гена варибельного поверхностного антигена. При хронической инфекции во время каждой последующей волны паразитемии экспрессируется новый вариант поверхностного антигена, что способствует размножению паразита несмотря на присутствие антител, выработанных в ответ на предыдущую волну паразитемии. Наконец, хотя и существуют животные модели (*Plasmodium yoelii* у грызунов), хороших моделей человеческой малярии нет. Однако сейчас, в связи с завершением секвенирования генома *P. falciparum*, есть надежда, что новые «кандидаты» вакцин могут

Дополнение 3-5 Жизненный цикл малярийного паразита

Инфицированный комар, кусая человека, впрыскивает в его кровотоки спорозоиты. Последние через кровь попадают в печень, где инфицируют гепатоциты. Через 8–25 дней, в зависимости от типа малярийного паразита, спорозоиты созревают до инфекционных тканевых шизонтов. Эти шизонты высвобождают в кровотоки 20–30 тыс. мерозоитов, которые инфицируют эритроциты. Цикл бесполой репликации затем продолжается в эритроцитах каждые 48–72 ч до тех пор, пока не начнется лечение, не выработается иммунитет или не наступит смерть. Синхронное высвобождение

зрелых мерозоитов из эритроцитов совпадает с внезапным приступом периодической лихорадки и озноба, характерных для болезни. Некоторые мерозоиты развиваются в мужские или женские гаметоциты, но превращения в гаметы и последующего оплодотворения не происходит, пока гаметоциты не будут захвачены комаром во время высасывания крови. В организме комара зигота развивается в ооцисту, которая разрывается с выделением спорозоитов. Последние перемещаются к слюнным железам и готовы к передаче новому хозяину — человеку.

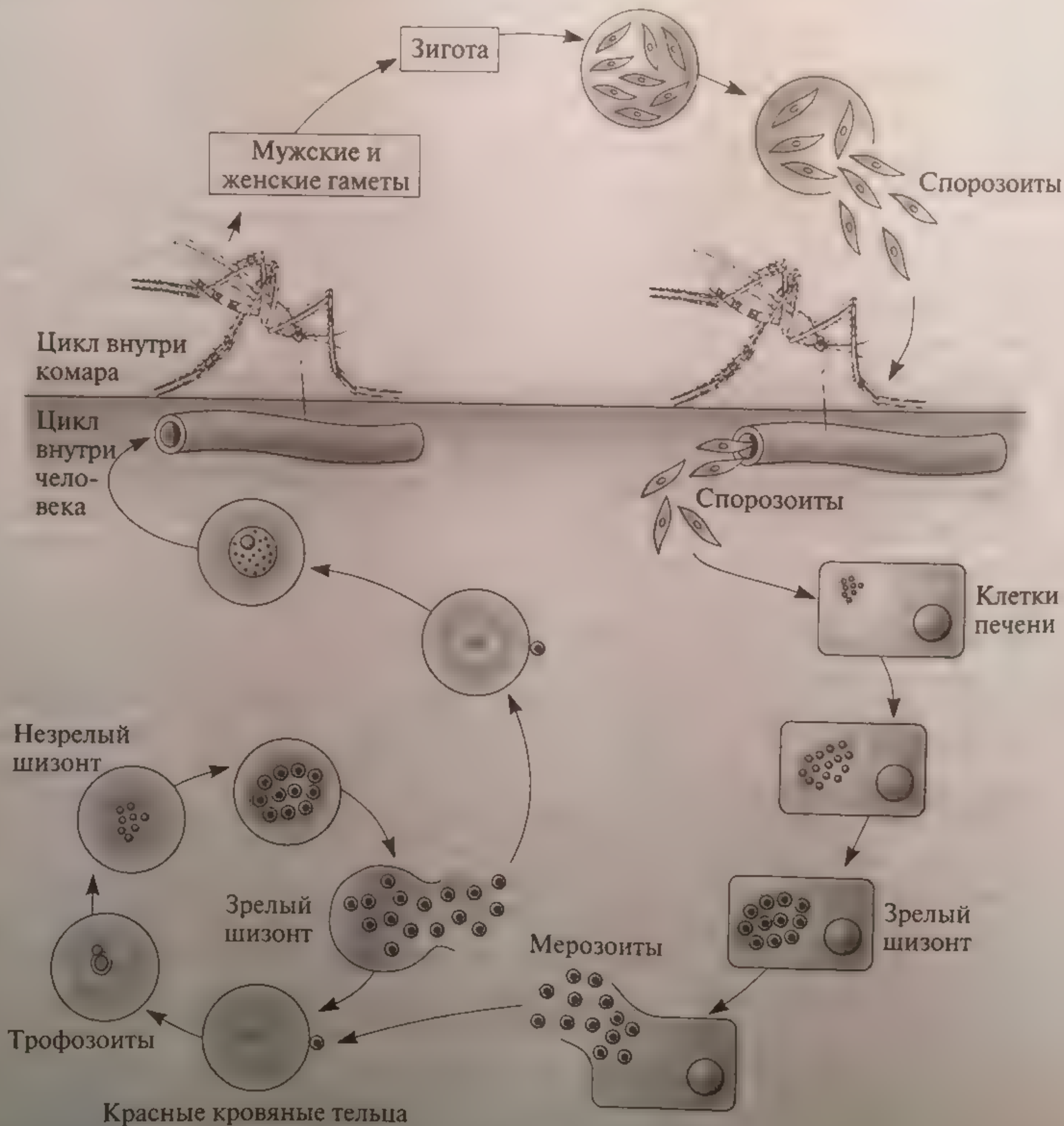


Рис. Д3-5 Жизненный цикл малярийного паразита.

быть идентифицированы аналогично тому, как это было описано ранее для бактерий (с. 104). Уже идентифицировано большое число белков, которые, вероятно, экспонированы на поверхности. Проблема теперь состоит в идентификации тех из них, которые обладают ограниченным антигенным разнообразием и экспрессируются на более чем одной стадии жизненного цикла.

Прогрессу в разработке новых антибиотиков для лечения протозойных инфекций способствовало секвенирование генома органеллы, уникальной для некоторых из этих патогенов. Эта органелла (так называемый апикопласт) найдена у таких человеческих патогенов, как *Plasmodium* (малярийный паразит), *Toxoplasma* и *Cryptosporidium*. Она представляет собой пластиду типа хлоропласта, и неудивительно, что многие ее гены (как показал анализ ее генома) обладают прокариотными свойствами. Это объясняет чувствительность паразитов, содержащих апикопласты, к антибиотикам, которые действуют на бактериальную транскрипцию и трансляцию, т. е. к рифампицину и доксициклину. Некоторые метаболические пути апикопластов были выявлены на основании секвенсных данных. Они тоже характерны больше для бактерий и растений, чем для клеток млекопитающих. Это обеспечивает новые мишени для разработки лекарств.

Изопреноиды — важнейшие липиды, в том числе холестерин и коэнзим Q (убихинон). Они синтезируются путем конденсации изопентенилдифосфата. У млекопитающих изопентенилдифосфат синтезируется из мевалоновой кислоты, а в бактериях и растениях — через 1-дезоксид-Д-ксилоулозо-5-фосфат (DOXP). Геномный анализ показал, что геном апикопластов кодирует два ключевых фермента получения DOXP: DOXP-синтазу и DOXP-редуктоизомеразу. Антибиотик фозидомицин ингибирует DOXP-редуктоизомеразу и, следовательно, должен быть эффективен против малярийного паразита, в то время как ингибитор пути синтеза мевалоновой кислоты не должен оказывать никакого эффекта. Это действительно так. Геном апикопластов также кодирует синтазу жирных кислот II типа, в то время как клетки млекопитающих используют синтазу I типа. Первая чувствительна к ингибированию триклозаном, вторая нет. Очень важно, что введение триклозана мышам, зараженным малярией, приводит к полному уничтожению малярийных паразитов, не оказывая вредного воздействия на организм хозяина.

К сожалению, трипаномы и *Leishmania* не содержат апикопластоподобных органелл, хороших мишеней для химиотерапии, но, возможно, секвенирование генома позволит идентифицировать потенциальные мишени. В случае африканской трипаномии геномика может обеспечить альтернативный подход. Сонную болезнь, вызываемую *Trypanosoma brucei*, распространяет кровососущая муха цеце. Питание и способность к размножению мухи зависят от облигатной эндосимбиотической бактерии *Wigglesworthia glossinidia*. Эта бактерия родственна *E. coli*, хотя размер ее генома составляет только

одну седьмую от генома последней. Геном *W. glossinidia* кодирует более 60 белков, участвующих в синтезе витаминов, которые муха не получает из своей ограниченной кровью диеты. Выбрав в качестве мишени продукты этих генов или другие белки *Wigglesworthia*, можно будет селективно убивать муху цеце.

Другая важная для репродукции насекомых бактерия — *Wolbachia*. В рамках проекта по секвенированию генома *Onchocerca volvulus* — филяриозного червя, вызывающего «речную слепоту» (онхоцеркоз) — случайно была определена последовательность генома *Wolbachia*. Присутствие бактерии *Wolbachia*, по-видимому, крайне важно для выживания *Onchocerca*, и это, возможно, позволит разработать новые лекарства для лечения филяриатоза.

Разработка противовирусных препаратов

Эффективные вакцины позволили ликвидировать или контролировать распространение ряда опасных вирусных патогенов, таких как оспа, корь, свинка, краснуха. Этот подход оказался неприемлем в случае других болезней, вызываемых такими вирусами, как ВИЧ, вирус гепатита С, вирусы, инфицирующие дыхательные пути, вирусы папиллом человека, вирусы герпеса и многие вирусы гемморрагических лихорадок. Если вакцины отсутствуют, то единственная альтернатива — использование противовирусных препаратов. В настоящее время лицензированы более 30 противовирусных препаратов, но большинство из них используется против очень узкого спектра вирусов, а 50% предназначены только для лечения ВИЧ-инфекции. Это прямое следствие механизмов их действия (см. ниже). Кроме того, очень немногие из них хорошо переносятся людьми, так как мишени лекарств у вирусов и у их хозяев различаются лишь незначительно.

Многие из продаваемых в настоящее время лекарств были отобраны классическим методом эмпирического скрининга веществ согласно их антивирусной активности. Сегодня этот эмпирический подход замещается рациональным дизайном ингибиторов, направленных на конкретные мишени. Данный подход в значительной мере опирается на понимание молекулярно-биологических основ размножения вирусов. Теоретически такие мишени могут быть выбраны на любой стадии вирусной инфекции: прикрепление, репликация, транскрипция, трансляция, сборка, освобождение. На практике большинство мишеней относятся к стадиям синтеза вирусной ДНК, расщепления вирусного полипротеина и освобождения вируса из клетки хозяина.

При большом многообразии вирусов их можно разделить всего лишь на семь типов, основываясь на структуре их геномов, механизмах репликации и экспрессии генов (табл. 3-8). Такое упрощение, предложенное лауреатом Нобелевской премии Дэвидом Балтимором, помогает понять, почему так узок спектр активностей некоторых ключевых противовирусных препаратов. Два примера приведены ниже.

Таблица 3-8

Характеристики

класс 1

класс 2

класс 3

класс 4

класс 5

класс 6

класс 7

Вирус

которая

Для лече

ных ана

собствен

на виру

ному ф

рис. 8-

тимиди

опояск

вирусо

огран

спектр

те ви

дезор

Р

тел

Таблица 3-8 Классификация вирусов по Балтимору

Класс	Характеристика
Класс 1	Геномы вирусов представлены двухцепочечной ДНК (dsDNA, дцДНК). Репликация ДНК и транскрипция происходят так же, как и соответствующие процессы в клетке хозяина. Транскрипция может идти с любой цепи ДНК
Класс 2	Геномы вирусов представлены одноцепочечной ДНК (ssDNA, оцДНК). ДНК может быть смысловой ((+)-цепь) и антисмысловой ((-)-цепь). ДНК должна перейти в двуцепочечную форму, чтобы мог начаться синтез мРНК
Класс 3	Геномы вирусов представлены двухцепочечной РНК (dsRNA, дцРНК), но транскрипция идет только с одной цепи. Для транскрипции с РНК-матрицы необходима РНК-зависимая РНК-полимераза, которая кодируется вирусом и упакована в вирусной частице
Класс 4	Геном вирусов представлен одноцепочечной РНК (ssRNA, оцРНК), имеющей только одну (+)-цепь, которая может транслироваться как мРНК. Репликация осуществляется через промежуточную двухцепочечную РНК (dsRNA, дцРНК)
Класс 5	Геном вирусов представлен одноцепочечной РНК (ssRNA, оцРНК), которая комплементарна мРНК (антисмысловая цепь). Это вирусы, содержащие (-)-цепь РНК. Синтез мРНК происходит путем транскрипции геномной цепи с участием кодируемых вирусом ферментов, которые упакованы в вирусную частицу
Класс 6	Геном вирусов представлен одноцепочечной РНК (ssRNA, оцРНК) с ((+)-цепью), но реплицируется через промежуточную двуцепочечную ДНК (dsDNA, дцДНК). Последняя синтезируется кодируемой вирусом обратной транскриптазой, упакованной в вирусной частице
Класс 7	Геном вирусов представлен двухцепочечной ДНК (dsDNA, дцДНК), но реплицируется с образованием промежуточной (+)-цепи РНК, прежде чем превратиться снова в двуцепочечную форму dsDNA (дцДНК) с помощью обратной транскриптазы. Такие вирусы называют «реверсивными»

Вирусы герпеса (класс 1) имеют двухцепочечную геномную ДНК, которая реплицируется кодируемыми вирусами ДНК-полимеразами. Для лечения герпес-вирусной инфекции используется ряд нуклеозидных аналогов, таких как ацикловир, ганцикловир и фамцикловир, способствующих терминции элонгации ДНК. Все эти вещества действуют на вирусную ДНК-полимеразу, но сначала подвергаются внутриклеточному фосфорилированию с образованием трифосфатной формы (см. рис. 8-7). Первая степень фосфорилирования осуществляется только тимидинкиназой, кодируемой вирусом простого герпеса и вирусом опоясывающего лишая, или протеинкиназой, кодируемой цитомегаловирусом. В этом случае активность указанных терапевтических агентов ограничена лишь клетками, инфицированными вирусом. Однако спектр противовирусного действия таких агентов распространяется на те вирусы, которые кодируют фермент, способный фосфорилировать дезоксирибонуклеозидные аналоги.

Ретровирусы, такие как ВИЧ, принадлежат к классу 6. Следовательно, для репликации вируса необходима обратная транскриптаза.



Рис. 3-8 Структуры некоторых соединений с антивирусной активностью.

Поскольку обратная транскриптаза в норме в клетках млекопитающих отсутствует, то она — привлекательная мишень для создания противовирусных препаратов. Были разработаны два типа ингибиторов обратной транскриптазы. Первый из них — дидезоксинуклеозиды, такие как азидотимидин (АЗТ); они действуют как субстраты обратной транскриптазы, но вызывают преждевременную терминацию цепи. Дидезоксинуклеозиды известны как нуклеозидные (аналоги) ингибиторы обратной транскриптазы (NRTIs, НИОТ). Второй класс ингибиторов — ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NNRTIs). Эти вещества взаимодействуют с аллостерическим центром связывания, который присутствует только в обратной транскриптазе ВИЧ-1. (рис. 3-8).

Вирусные протеазы чрезвычайно важны для жизненного цикла многих вирусов, включая ВИЧ, вирусы герпеса и риновирусы (вызывают нашу обычную простуду). Эти протеазы расщепляют вновь экспрессированные полипротеины-предшественники на более короткие функциональные и структурные вирусные белки. Из-за своей ключевой роли в размножении вирусов они являются привлекательными объектами для действия противовирусных препаратов, и несколько ингибиторов протеаз (PIs) лицензированы для лечения ВИЧ-инфекций (дополнение 3-6).

Как отмечалось ранее, вирусы используют такие же ферменты, как и их хозяева млекопитающие, что крайне затрудняет разработку нетоксичных противовирусных препаратов. Один из подходов, который позволяет избежать таких проблем, — использование антисмысловых (антисенс)

Дополнение 3.6. Высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААВТ, или *англ.* HAART) при лечении СПИДа

Развитие у вирусов устойчивости к противовирусным препаратам, используемым при лечении ВИЧ-инфекции, — главная причина терапевтических неудач и ограничения свободы выбора альтернативных режимов лечения. Чтобы предотвратить появление устойчивости, обычно практикуют лечение ВИЧ-инфицированных, назначая комбинацию по крайней мере трех лекарств, т. е. применяя высокоактивную антивирусную терапию (ВААВТ). Как правило, комбинированная терапия включает два NRTI плюс PI или NNRTI, хотя иногда можно использовать три препарата NRTI. Стратегия ВААВТ описана ниже.

Популяция вирусов у человека, инфицированного РНК-содержащим вирусом, таким как ВИЧ, называется квазиштаммами из-за существования генетически отличных вирусных вариантов, которые происходят от первоначального штамма. Варианты появляются из-за того, что РНК-полимеразы не имеют корректирующей активности, найденной у ДНК-полимераз. Таким образом, когда одноцепочечные РНК вирусов реплицируются, то каждый вновь скопированный геном отличается от родительского в среднем на один нуклеотид. Согласно оценкам, на стадии установления ВИЧ-инфекции производится 10 млрд вирионов ВИЧ в день. Если каждый содержит в среднем одну мутацию на 9200-нуклеотидный геном, то способный к репликации вирус с одной мутацией, вызывающей устойчивость к лекар-

ству, по-видимому, генерируется каждый день. Двойные мутанты возникают реже, а вероятность трех или более мутаций в одном геноме очень низка.

К некоторым противовирусным препаратам, таким как ламивудин (NRTI) и NNRTI, высокая устойчивость может быть вызвана одной мутацией в ВИЧ. Для некоторых других лекарств, таких как зидовудин (NRTI) и некоторых ингибиторов протеазы высокая устойчивость возникает только в результате накопления в одном и том же вирусном геноме трех или более мутаций. Из клинической практики при проведении ВААВТ известны два обстоятельства. Первое: чем выше концентрация ингибитора протеазы в плазме, тем медленнее появляются мутации, вызывающие устойчивость. Второе: чем ниже уровень РНК ВИЧ в плазме, тем дольше период успешного использования лекарства. У пациентов с супрессией плазменной РНК ВИЧ до уровня ниже 50 копий на мл в течение 1 года не было обнаружено резистентных мутаций, даже несмотря на то что продолжал существовать (персистировать) способный к репликации вирус. Ясно, что лекарства, к которым высокая устойчивость возникает в результате лишь одной мутации, должны оставаться резервными для особых случаев, и их не стоит назначать в самом начале комбинированной терапии.

Новые методы борьбы со СПИДом описаны на с. 243.

препаратов (см. также с. 240). Эти препараты представляют собой олигонуклеотиды, комплементарные специфическому участку кодируемой вирусом мРНК. Связываясь с мРНК с образованием двухспиральных структур, они специфически ингибируют трансляцию кодируемых вирусом белков. Поскольку короткие олигонуклеотиды легко деградируют внутри клеток хозяина, антисмысловые лекарства синтезируются из нуклеозидных аналогов, устойчивых к действию нуклеаз. К настоящему времени только один антисмысловый препарат получил лицензию на продажу. Он предназначен для лечения ретинита, вызванного цитомегаловирусом. Лечение осуществляется путем прямой инъекции препарата в глазное яблоко. Одна из главных проблем антисмысловых препаратов — проблема доставки их к мишени.

Дополнительная литература

POGM: В гл. 14 есть раздел, посвященный использованию комбинаторного биосинтеза для создания новых антибиотиков.

POGA: В гл. 4 детально описаны различные методы детекции физических маркеров в геноме, которые используют микробиологи для типирования бактерий и вирусных штаммов.

Этот обзор охватывает все, что может быть интересным про биотерроризм:

Atlas RM (2002) Bioterrorism: from threat to reality. *Annu Rev Microbiol* 56, 167–185.

Потрясающий анализ эпидемиологии VREs (ванкомицин-устойчивых энтерококков):

Bonten MJM, Willems R, Weinstein RA (2001) Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis* 1, 314–325.

Эта статья содержит все, что вы хотели бы узнать об противовирусных препаратах:

De Clercq E (2002) Strategies in the design of antiviral drugs. *Nature Rev Drug Discovery* 1, 13–25.

Два великолепных обзора, которые дают представление о механизмах бактериальной патогенности с двух разных точек зрения:

Finlay RB, Falkow S (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 136–169.

Joyce EA, Chan K, Salama NR, Falkow S (2002) Redefining bacterial populations: a post-genomic reformation. *Nature Rev Genet* 3, 462–473.

Grandi G (2001) Antibacterial vaccine design using genomics and proteomics. *Trends Biotechnol* 19, 181–188.

Статья, посвященная детальному анализу генетической структуры и происхождения MRSA:

Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T (2001) The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 9, 486–493.

Статья, заслуживающая наибольшего внимания из числа статей, опубликованных в том же выпуске журнала и касающихся исследования малярийного паразита методами геномики и протеомики:

Gardner MJ, Hall N, Fung E *et al* (2002) The genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498–511.

Подробный обзор (с математическим уклоном) методов идентификации островков патогенности:

Karlin S (2001) Detecting anomalous gene clusters and pathogenicity islands in diverse bacterial genomes. *Trends Microbiol* 9, 335–343.

Loferer H (2000) Mining bacterial genomes for antimicrobial targets. *Mol Med Today* 6, 470–474.

Великолепный обзор использования мутагенеза методом мечения маркером:

Mecas J (2002) Use of signature-tagged mutagenesis in pathogenesis studies. *Curr Opin Microbiol* 5, 33–37.

Schoolnik GK (2002) Functional and comparative genomics of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 5, 20–26.

Исследование и лечение генетических заболеваний

Типы генетических заболеваний

Все генетические болезни можно разделить на три типа: моногенные болезни, хромосомные аномалии и полигенные болезни. Моногенные болезни вызываются мутациями в одном гене в аутосоме, половой хромосоме или в митохондриальной ДНК. Независимо от того, являются ли мутации доминантными или рецессивными, они проявляют очевидные и характерные паттерны наследования. Хотя та или иная моногенная болезнь может быть редкой в популяции в целом, в сумме такие болезни затрагивают 2% населения на той или иной стадии жизни. Доля серьезных моногенных дефектов у маленьких детей составляет 0,36%, но возрастает до 6% у госпитализированных детей.

Хромосомные аномалии имеют несколько форм. Они включают избыток или недостаток либо части, либо всей хромосомы или транслокацию части хромосомы в новое место. Такие аномалии наблюдаются у 0,7% выживших новорожденных, но частота встречаемости возрастает до 50%, если рассматривать спонтанные выкидыши, происходящие в первые 3 месяца беременности. Хромосомные аномалии чрезвычайно характерны для раковых клеток, но являются результатом клонального размножения мутаций соматических клеток. Такие аномалии не наследуются, однако предрасположенность к их образованию может передаваться.

До недавнего времени полигенные болезни чаще всего не рассматривались как генетические заболевания, поскольку для них не наблюдается характерного типа наследования и выраженность болезни может зависеть от образа жизни больного. Даже когда генетический компонент признавался, все равно многое оставалось неясным. Полигенные болезни — это результат не одиночной мутации в одном гене, а следствие небольших изменений в ряде генов, которые в совокупности могут вызывать предрасположенность индивидуума к серьезному дефекту. Частоту встречаемости полигенных болезней трудно определить, но, по современным оценкам, она варьирует в диапазоне от 5% у детей до более чем 60%, у всего

населения, причем наибольший вклад наблюдается со стороны пожилой части населения.

В настоящее время помочь больным с хромосомными аномалиям практически ничем нельзя. Однако недавние достижения в области биотехнологии и геномики дали ряд замечательных методов лечения пациентов с моногенными заболеваниями. Эти достижения включают: производство терапевтических белков, антисенс-терапию, генную терапию и генную репарацию. Разработка новых молекулярно-диагностических методов также позволила усовершенствовать пренатальную диагностику, что, однако, может привести к сложным этическим проблемам. За последние 5 лет наше понимание механизмов возникновения полигенных болезней сильно выросло. На данном этапе пока еще слишком рано думать о влиянии на клиническую практику, но одно из возможных приложений имеющихся знаний — более адекватный подбор лекарств, соответствующих проявлениям болезни (**персонализированная медицина**). Это также изменит подход к апробации новых лекарств на стадии клинических испытаний.

Главным двигателем прогресса в лечении генетических болезней будет продолжение анализа информации, полученной в результате секвенирования полного генома человека и геномов родственных организмов, таких как мышь. Эта информация должна способствовать новому пониманию многих болезней и разработке гораздо более эффективных инструментов диагностики, профилактических мер и методов лечения.

Диагностика моногенных болезней

Различают мутации двух типов: точковые мутации, вызванные однонуклеотидными заменами, и мутации, включающие большие полинуклеотидные участки, вставки (инсерции) и делеции (табл. 4-1). Следует отметить, что некоторые делеции могут распространяться на смежные гены. Болезни, вызываемые такими делециями, не являются, строго говоря, моногенными.

Не все однонуклеотидные замены внутри гена приводят к фенотипическому эффекту (генетическому заболеванию). Это связано с тем, что замена нуклеотида может не привести к изменению аминокислотной последовательности белка, а если приведет, то результирующая замена может и не изменить функциональных свойств белка. Тем не менее, мутированный ген генетически отличен, и такая замена известна как однонуклеотидный полиморфизм (ОНП или *англ.* SNP, что произносится «снип»). ОНП также встречаются в некодирующих районах генома, и, как будет видно далее, они очень полезны в диагностике генетических болезней и исследовании полигенных расстройств.

Существует много различных методов определения моногенных заболеваний. Все они в той или иной степени основаны на гибридизации аллель-специфических олигонуклеотидов. Самые ранние молеку-

Таблица 4-1
Генетическое из-

Миссенс-мута-
ция, которая за-
меняет один а-
минокислотный

Нonsense-мута-
ция, которая за-
меняет код на ко-
д стоп, что приво-
дит к образованию

Мутация в се-
quence, которая не

Регуляторная
мутация, которая
изменяет экспрес-
сию фактора

Вставки или

Добавление
числа основани-
я, основанного
рамки считыва-

Добавление
числа оснований
к последователь-

Встраивание
фрагмента ДНК
как элемента

Увеличение
числа нуклеоти-

Лямбда-вектор
для клонирования

Последователь-
ность мер

Анализ ИС

Контроль

Вспомогатель-

Результат

Таблица 4-1 Примеры моногенных заболеваний

Генетическое изменение	Пример
Точковая мутация	
Миссенс-мутация, приводящая к замене аминокислоты в белке и влияющая на белковую функцию	Замена А на Т в 6-м кодоне гена β -глобина вызывает замену остатка глутаминовой кислоты на валин, что приводит к серповидноклеточной анемии
Нонсенс-мутация, вызванная появлением преждевременного стоп-кодона, что приводит к образованию укороченного белка	Мутация в кодоне 39 гена β -глобина вызывает замену остатка глутамина на стоп-кодон, что приводит к β^0 -талассемии
Мутация в сайтах процессинга РНК, приводящая к аномальному сплайсингу	РНК-сплайсинговые мутанты являются наиболее распространенной причиной β -талассемии
Регуляторная мутация, влияющая на генную экспрессию, например на связывание фактора транскрипции	Замена G на A в более удаленной от точки инициации транскрипции (upstream) части промотора гена γ -глобина приводит к наследственной персистенции фетального гемоглобина
Вставки или делеции	
Добавление или устранение небольшого числа оснований (трех или кратных трем оснований) без сдвига трансляционной рамки считывания	Делеция трех оснований в гене, связанном с кистозным фиброзом, приводит к удалению остатка фенилаланина в соответствующем белке; является причиной большинства случаев заболевания кистозным фиброзом у людей европеоидной расы
Добавление или устранение небольшого числа оснований со сдвигом рамки считывания	Вставка четырех оснований в ген гексозаминидазы А вызывает болезнь Тэя-Сакса у евреев ашкенази
Встраивание диспергированных повторяющихся последовательностей, таких как элементы Line и Alu	
Увеличение (экспансия) числа тринуклеотидных повторов	Более чем 35 копий повтора CAG в гене хантингтина приводит к болезни Хантингтона у взрослых

лярно-биологические методы включали электрофоретическое разделение ДНК человека расщепленной эндонуклеазой рестрикции и последующую гибридизацию с зондами по Саузерну (см. гл. 1). Пример использования этого метода — детекция точковой мутации в гене α_1 -антитрипсина, который ответствен за наследственную эмфизему. Использовались два 19-звенных олигонуклеотида, один из которых комплементарен нормальному аллелю, а другой — мутантному. Этого вполне достаточно (рис. 4-1), чтобы различить нормального и больного индивидуумов, а также гетерозиготного (носителей); другие примеры показаны на с. 28.

Преимущество методов, основанных на использовании твердых матриц (как в описанном выше случае) заключается в том, что результат

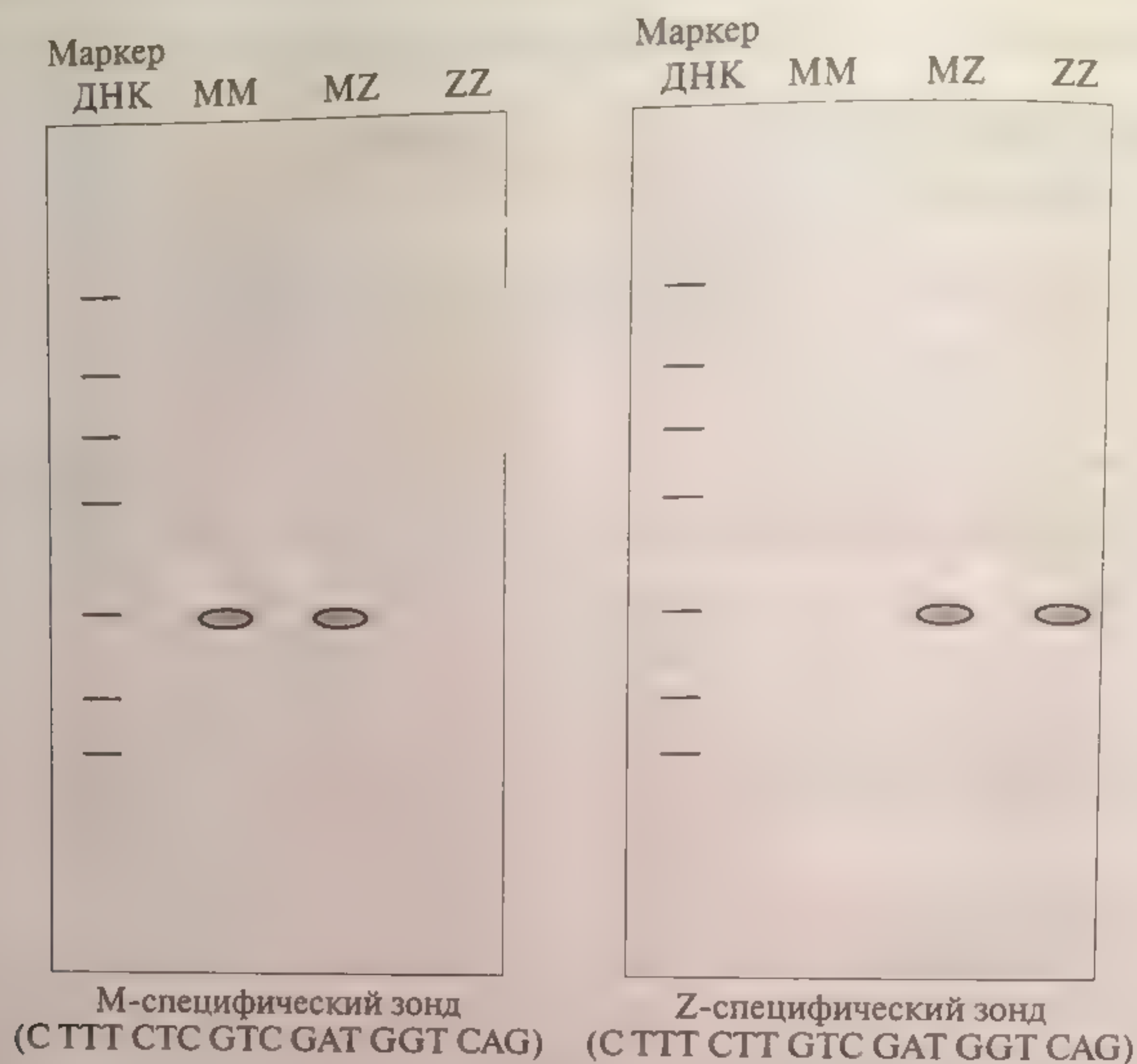


Рис. 4-1 Схема использования олигонуклеотидных зондов для детекции нормального гена α_1 -антитрипсина (М) и его Z-вариантов. Человеческую ДНК, полученную из нормального (ММ), гетерозиготного (МZ) и гомозиготного (ZZ) организмов, расщепляют эндонуклеазой рестрикции, подвергают электрофорезу и после переноса фрагментов на нейлоновую мембрану проводят гибридизацию по Саузерну. Наблюдаемые картины получены радиоавтографией фильтров после гибридизации с нормальным (М-специфическим) или мутантным (Z-специфическим) зондом.

получается в виде «изображения», которое легко интерпретировать. Недостатком является то, что эти методы включают электрофорез и блоттинг по Саузерну, что требует затрат времени и средств. К счастью, был разработан ряд методов детекции мутаций в растворе. Наиболее популярный из них — метод TaqMan (рис. 4-2). В этом методе район ДНК длиной 100 н. п., содержащий сайт полиморфизма, амплифицируется с помощью ПЦР в присутствии двух зондов, каждый из которых специфичен для одного или другого аллеля. Зонды имеют репортерную флуоресцентную метку на 5'-конце, не способную флуоресцировать в растворе, поскольку на 3'-конце находится гаситель флуоресценции. Во время ПЦР *Taq* ДНК-полимераза встречает на своем пути зонд, специфически спаренный со своей мишенью, и отщепляет флуоресцентную метку (благодаря 5'-экзонуклеазной активности), которая, переходя в раствор, увеличивает общую флуоресценцию. Наличие двух зондов, содержащих различные флуоресцентные метки, позволяет детектировать оба аллеля в одной пробирке без какой-либо обработки реакционной смеси после ПЦР.

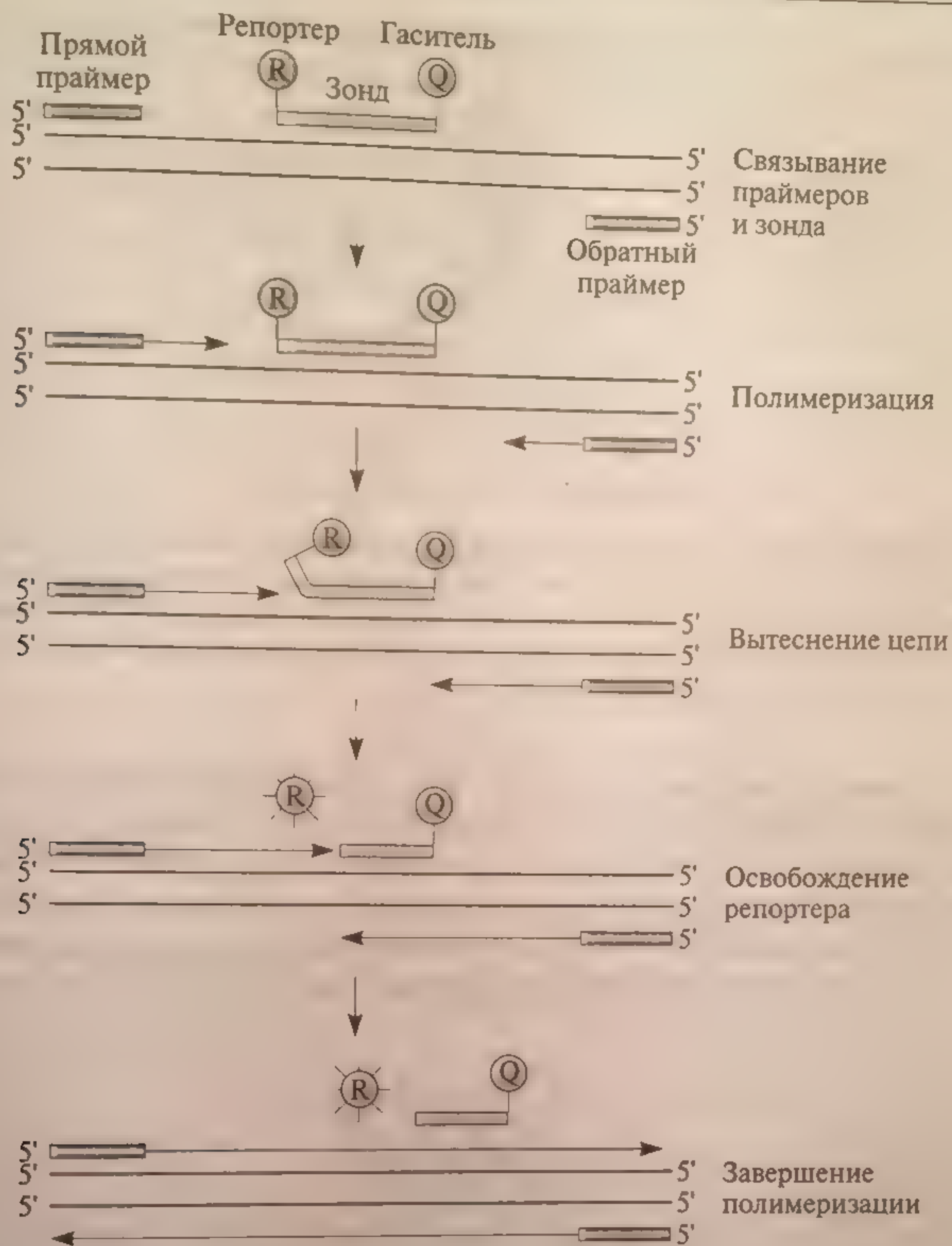


Рис. 4-2 Метод TaqMan (см. подробности в тексте).

Альтернативный подход — использование молекулярных «маяков» («шпилек»). Этот «маяк» представляет собой олигонуклеотидный зонд. Последний содержит два комплементарных друг другу фрагмента, фланкирующих комплементарную специфической мишени последовательность, а также репортерную флуоресцирующую метку и гаситель флуоресценции, расположенные на разных концах (рис. 4-3). После проведения ПЦР-амплификации добавляется молекулярный «маяк». Если происходит его гибридизация с целевой ДНК, то флуорофор и гаситель удаляются друг от друга, и наблюдается возрастание флуоресценции. Молекулярные «маяки» могут быть приготовлены с использованием различных флуорофоров, имеющих различные цвета (длины волн флуоресценции), что позволяет анализировать множественные мутации одновременно.

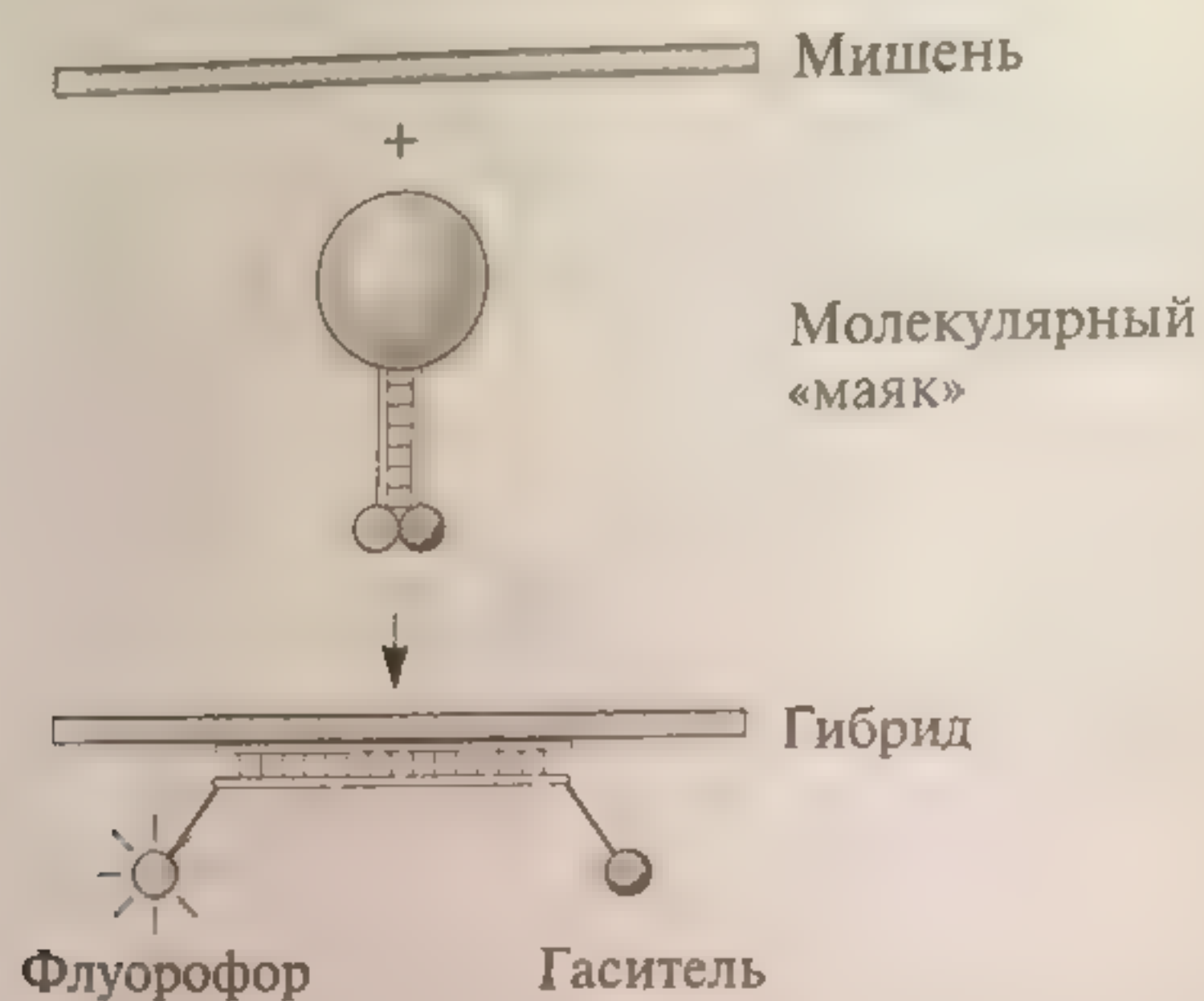


Рис. 4-3 Принцип молекулярных «маяков». Сами по себе эти молекулы не флуоресцируют, так как «шпилька» удерживает флуорофор близко к гасителю. Когда последовательность петли зонда гибридизуется со своей мишенью, образуя жесткую двойную спираль, то происходит конформационная перестройка, которая удаляет гаситель от флуорофора, восстанавливая флуоресценцию.

Приведенные выше методы пригодны в тех случаях, когда известно, что генетическая болезнь вызывается только одной или небольшим количеством мутаций. В случае большого числа различных мутаций (например, в гене β -глобина) приходится пользоваться другими методами. Если в исследуемом гене предположительно может существовать множество различных делеций, то полезно воспользоваться вестерн-блоттин-

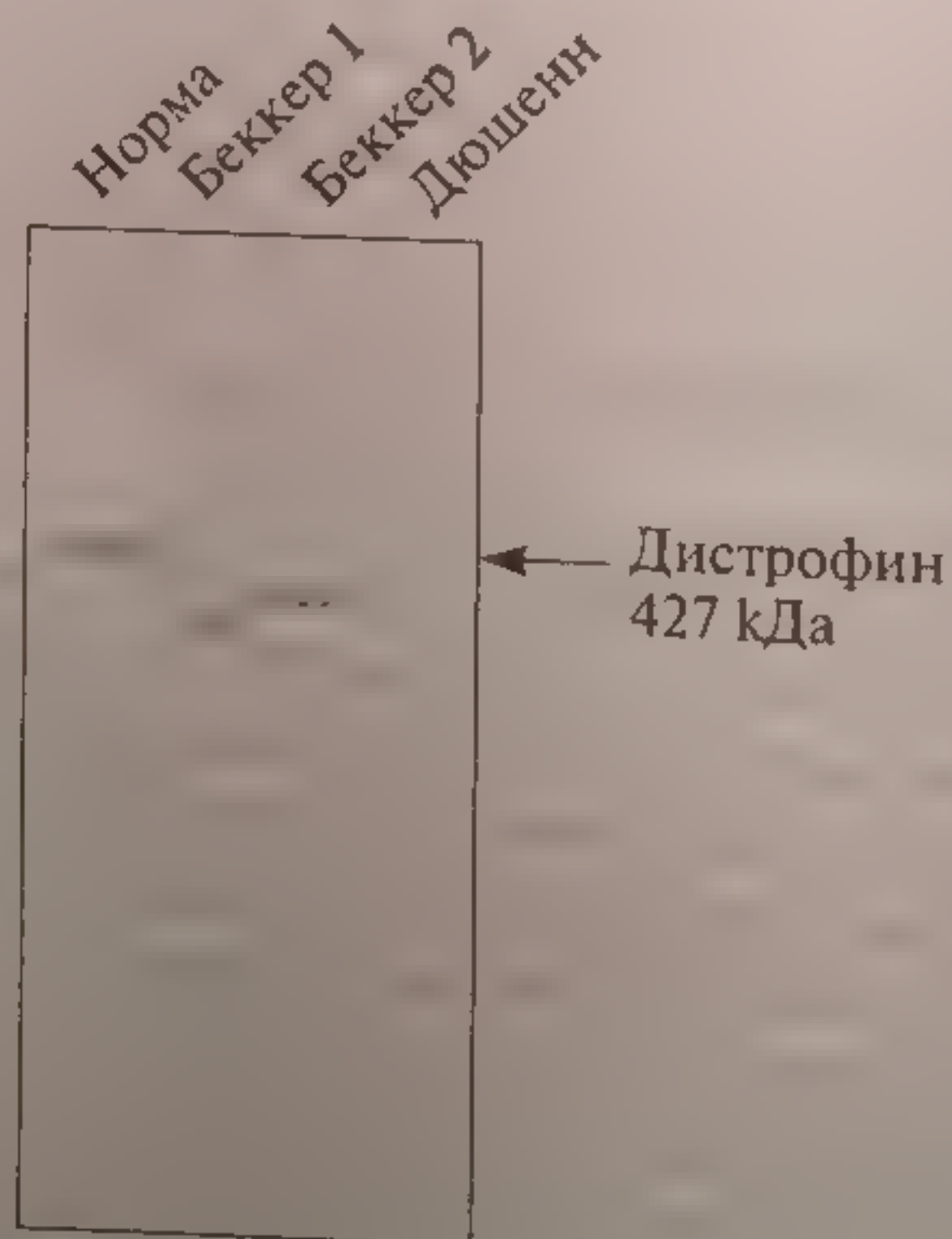


Рис. 4-4 Результаты вестерн-блоттинга, демонстрирующие наличие или отсутствие мышечного белка дистрофина (стрелка) в белковых экстрактах проб. Пробы получены от пациентов, страдающих X-связанной мышечной дистрофией Дюшенна (тяжелая форма) или Беккера (легкая форма).

гом. В этом методе белки, выделенные из клеточного экстракта, разделяются по размеру электрофорезом в полиакриламидном геле, а затем переносятся на мембрану. Мембрану инкубируют в растворе, содержащем антитела, которые специфически узнают анализируемый белок. Специфическое взаимодействие между антителом и его антигеном детектируется добавлением второго антитела, специфического к первому антителу, которое несет гистохимический или флуоресцентный маркер. Пример использования этой методологии при анализе пациентов с мышечной дистрофией показан на рис. 4-4.

Детекцию варьирующих по числу tandemных повторов, таких как тринуклеотидные «экспансии», следует осуществлять с использованием саузерн-блоттинга. В этом случае ведутся поиски изменений в размере рестрикционных фрагментов, несущих интересующий район (рис. 4-5).

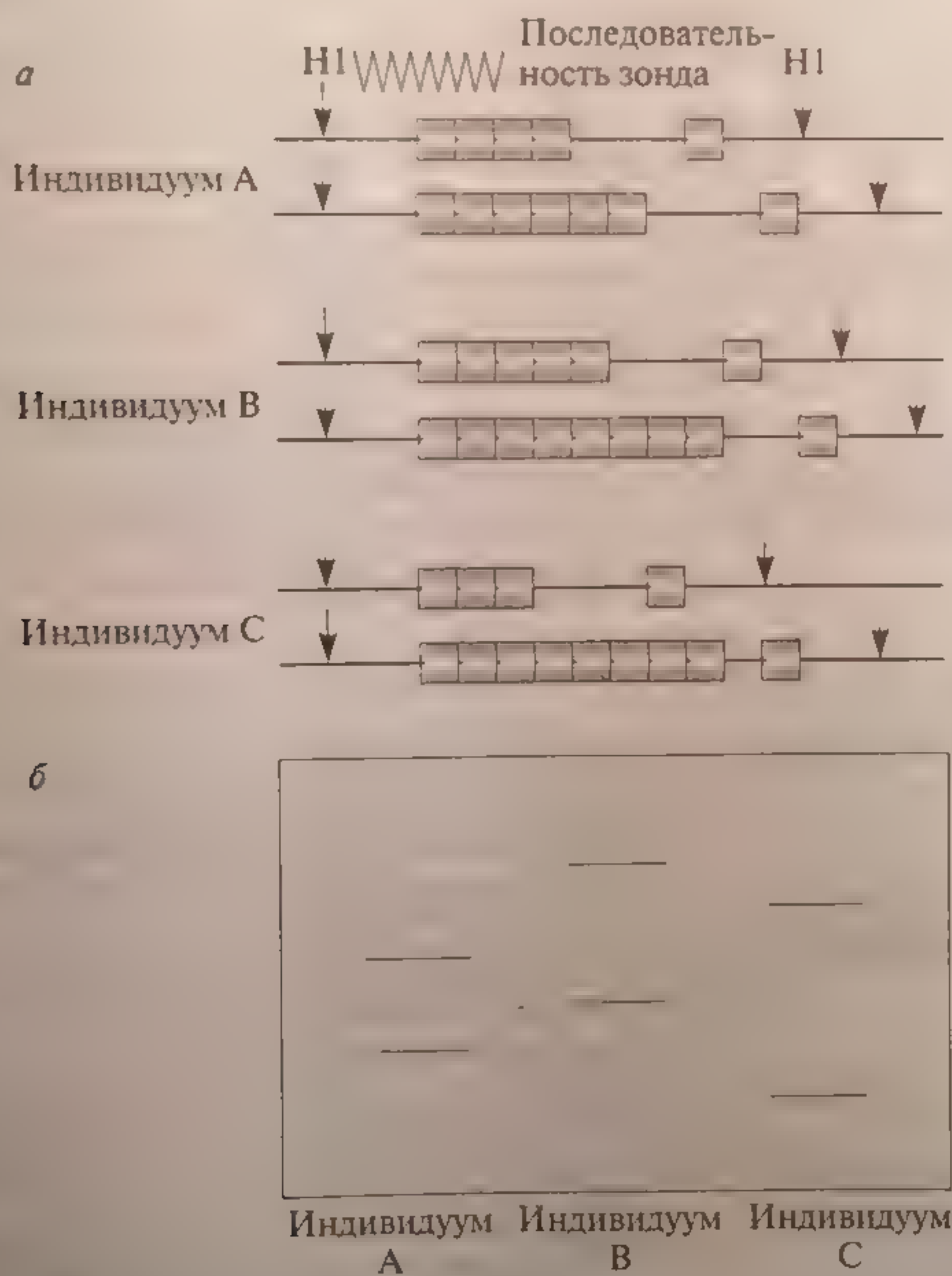


Рис. 4-5 Полиморфизмы длин рестрикционных фрагментов, вызванные различным числом tandemных повторов между сайтами рестрикции *HinFI*. *a* — структура ДНК трех различных индивидуумов; *б* — результаты электрофореза разрезанных с помощью *HinFI* образцов ДНК, полученных от трех индивидуумов, и последующей гибридизации с использованием зонда, комплементарного последовательности, показанной на рис. *a* «гребенкой».

Лечение моногенных болезней

В настоящее время лечение моногенных болезней основано преимущественно на замене дефектного белка, улучшении его функционирования или минимизации последствий его дефицита. К сожалению, эффективная терапия, приводящая к выздоровлению, невозможна для более чем 80% заболеваний. Существует ряд причин такого неудовлетворительного со-

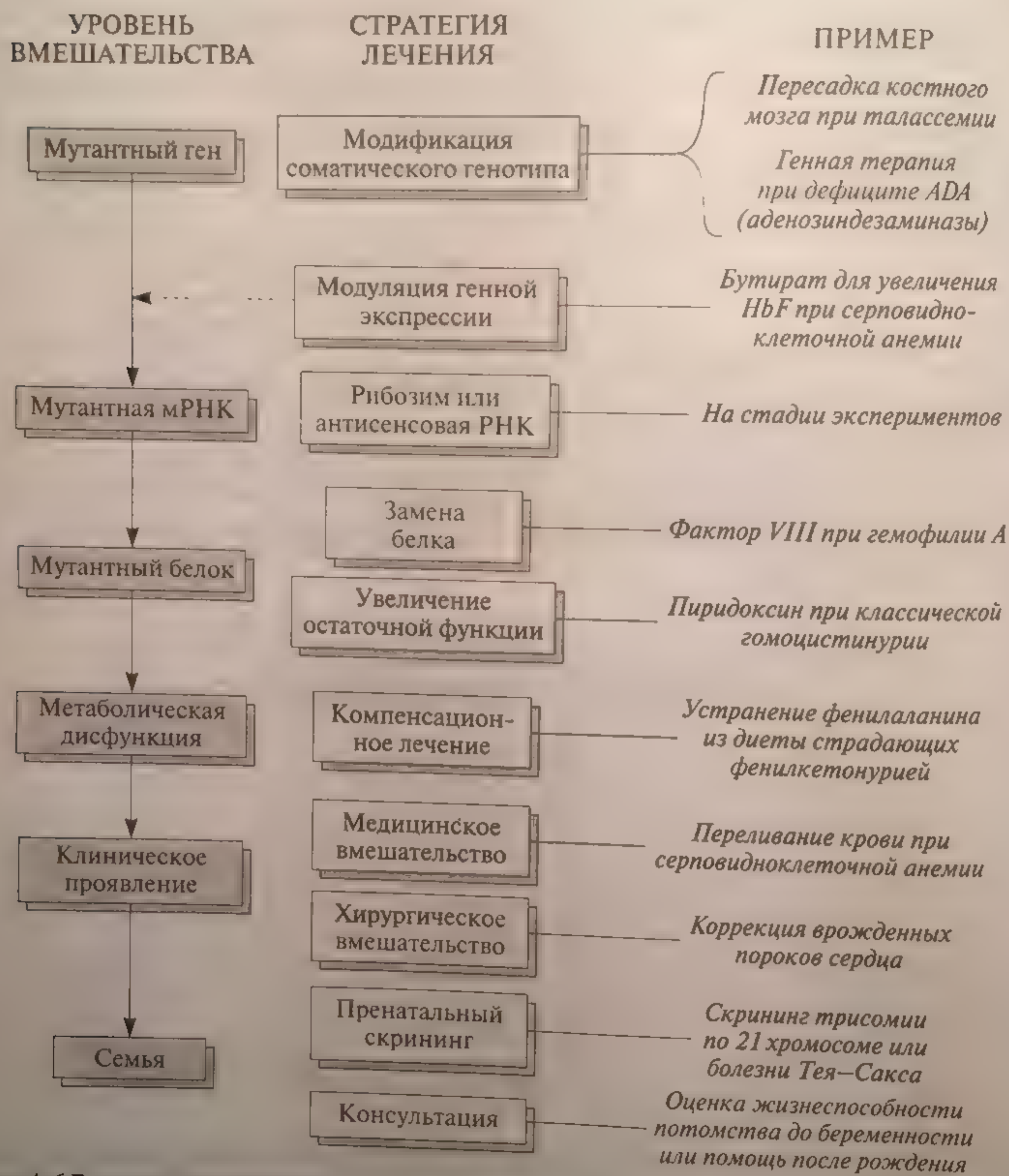


Рис. 4-6 Различные методы лечения генетических болезней. Если младенцам давать бутират, то он может предотвратить постнатальное переключение с γ -глобина на β -глобин по неизвестному механизму. При гомоцистинурии из-за дефицита цистатион-синтетазы кофактор (пиридоксальфосфат) не связывается с апоферментом, но пациенты реагируют на высокие дозы витамина B₆ (пиридоксина — предшественника пиридоксальфосфата).

стояния дел. Во-первых, исследования показали, что вероятность успешного лечения гораздо выше, если известен основной биохимический дефект и его патогенез полностью понятен. В настоящее время генный дефект неизвестен для большинства моногенных заболеваний, еще меньше известно о его влиянии на патофизиологию заболевания, но эта ситуация должна сильно измениться в лучшую сторону после расшифровки генома человека. Во-вторых, некоторые мутации оказывают действие на стадии развития плода, и после рождения ребенка уже слишком поздно начинать лечение. Это подчеркивает пользу пренатальной диагностики, так как, возможно, станет доступным лечение *in utero* (внутриутробно). Например, действие ацидурии, вызванной дефицитом биотинидазы, или метилмалонической ацидурии может быть нейтрализовано приемом во время беременности биотина и кобаламина соответственно.

Различные подходы, которые могут быть использованы при лечении генетического заболевания, приведены на рис. 4-6. Некоторые методы терапии имеют биотехнологические корни. Самый известный подход — замена белка; примеры использования рекомбинантных терапевтических белков для лечения генетических болезней приведены в табл. 4-2. Продукция этих белков описана в гл. 6. Следует отметить, что главный недостаток терапевтических белков в том, что их нужно вводить в организм путем инъекций, и это ограничивает их применимость.

Альтернативный путь использования технологии рекомбинантных ДНК — коррекция моногенного заболевания путем введения корректирующих генов в **соматические** ткани; метод известен как генная терапия. Существует три варианта метода, и все они пока находятся на очень ранней стадии разработки. Наиболее продвинутый из этих методов — введение в ткань полностью функционирующего гена, который способен компенсировать мутантный клеточный ген, содержащий мутацию, приводящую к потере функции. Это общепризнанная концепция генной терапии, и ее действенность была продемонстрирована для нескольких пациентов с гемофилией В (отсутствие фактора IX), дефицитом аденозиндезаминазы и тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID, дефект цитокино-

Таблица 4-2 Некоторые генетические заболевания, которые можно лечить рекомбинантными белками

Болезнь	Терапевтический белок
Гипофизарная карликовость	Гормон роста человека
Гемофилия А	Фактор VIII
Гемофилия В	Фактор IX
Наследственная эмфизема	α_1 -Антитрипсин
Болезнь Гоше	Глюкоцереброзидаза
Дефицит ADA	Аденозиндезаминаза

вого рецептора). Методы, используемые для осуществления генной терапии, детально рассмотрены в гл. 8.

В описанном выше варианте генной терапии обработанные клетки несут новый функциональный ген в дополнение к дефектному. Такой подход имеет два недостатка. Во-первых, экспрессия многих генов находится под сложным регуляторным контролем, и для осуществления эффективной генной терапии может потребоваться, чтобы новый ген был снабжен необходимыми регуляторными последовательностями. Во-вторых, многие гены млекопитающих очень большие. Например, в случае мышечной дистрофии Дюшенна кДНК гена дистрофина содержит 11 тыс. п. н., что значительно превышает те размеры вставок, которые способны удерживать векторы нового поколения, используемые для генной терапии. В этих случаях лучшей альтернативой была бы **коррекция** дефектного гена, а не добавление нового функционального гена. Иногда это называют **генной репарацией**. Суть этого подхода заключается в том, что функционирующий ген вводится в клетку нужной ткани и репарация индуцируется путем стимуляции гомологичной рекомбинации. Отметим, что генная репарация пригодна в случае тех генетических заболеваний, когда мутация находится в регуляторном районе и приводит к снижению экспрессии генного продукта.

В некоторых случаях генетическая болезнь возникает в результате суперэкспрессии одного или более генов из-за мутации в гене регулятор-

Дополнение 4-1 Рибозимы

Рибозимы — это каталитические молекулы РНК, которые содействуют протеканию биохимических реакций в отсутствие вспомогательных белков. Катализируемые молекулами РНК реакции могут быть внутримолекулярными или межмолекулярными. Пример внутримолекулярной реакции — сплайсинг интронов. В случае межмолекулярных реакций другие молекулы РНК служат субстратами, а рибозим — катализатором, т. е. рибозим действует точно так же, как обычный фермент, и после реакции остается неизмененным. Наилучший пример природного рибозима, катализирующего межмолекулярные реакции, — это РНК-компонент бактериальной рибонуклеазы Р, фермента, участвующего в созревании молекул тРНК. Этот фермент состоит из комплекса белок — РНК, но РНК-компонент может непосредственно расщеплять молекулы тРНК. Действительно, сам белковый компонент не обладает РНазной активностью, и его роль, по-видимому,

заключается в предотвращении электростатического отталкивания между РНК-субстратом и рибозимом, несущими отрицательные заряды.

С помощью современных методов молекулярной биологии можно сконструировать рибозимы, обладающие терапевтическими свойствами, способные узнавать, связывать и расщеплять специфические последовательности мРНК. Специфическое связывание достигается путем введения в рибозим последовательности, комплементарной целевой мРНК. Благодаря ферментативной активности рибозима после связывания происходит расщепление мРНК, что предотвращает ее трансляцию в белок. Пример терапевтического рибозима — Herzyme, мишенью которого является эпидермальный фактор роста человека 2 (см. гл. 8). Herzyme находится на стадии клинических испытаний с целью определения его эффективности в качестве противоракового препарата.

ного белка. Например, многие раковые клетки имеют мутации в гене, кодирующем белок p53, ДНК-связывающий транскрипционный фактор, который выступает в роли опухолевого супрессора. Можно было бы использовать обычную генную терапию для стимуляции синтеза функциональных копий регуляторного белка. В качестве альтернативы генная терапия может быть направлена на снижение уровня трансляции суперэкспрессированных белков. Такой подход был реализован в культуре тканей двумя путями. В первом из этих методов с помощью векторов вводится ген, который транскрибируется, давая антисмысловую (антисенс) РНК (см. с. 240). Во втором случае вводимый ген кодирует рибозим, молекулу РНК, которая может расщеплять молекулу мРНК очень специфично (дополнение 4-1).

Поиск генов, ответственных за моногенные болезни, и выявление их функций

Как отмечалось ранее, эффективное лечение генетических заболеваний требует понимания биохимической природы дефекта, вызываемого исследуемой мутацией. Для этого дефектный ген необходимо выделить и определить его функцию. Для выделения генов, необходимо знать их локализацию в хромосоме. Поэтому на практике начинают с создания коллекций родословных, в которых интересующий ген сегрегирует. Эти семейства исследуются с помощью множественных полиморфных маркеров до тех пор, пока не будут получены данные о хромосомной локализации гена. Затем определяется сцепление с другими маркерами на этой хромосоме. Ясно, что чем больше число маркеров на хромосоме, тем более успешными будут данные картирования. Чем ближе интересующий ген расположен к известному маркеру, тем легче будут проходить дальнейшие стадии. В связи с тем, что число имеющихся человеческих фенотипических признаков (генетических маркеров) ограничено и они расположены на далеком расстоянии друг от друга, генетики разработали полный набор молекулярных маркеров, которые распределены равномерно вдоль генома. ОНП (SNPs) (см. с. 40) — наиболее предпочтительные маркеры, поскольку они встречаются в среднем один раз на каждые 1000 п. н. Точная локализация интересующего гена облегчается, если соответствующий признак ассоциирован с цитогенетически видимой хромосомной аномалией.

Позиционное клонирование

Как только ген картирован на хромосоме, его точная локализация и функция могут быть установлены с помощью одного из двух подходов: позиционное клонирование и метод гена-кандидата. Хороший пример позиционного клонирования — выделение и характеристика гена мышечный дистрофии Дюшенна (МДД). В этом случае изоляции гена способствовало

наличие индивидуумов, у которых болезнь явилась результатом делеции части гена или его транслокации. Такие цитогенетические дефекты позволили локализовать ген в районе p21 X-хромосомы. Наличие пациентов с делециями гена позволило провести «вычитательное» клонирование. Для этого геномную ДНК, взятую от нормального индивидуума, расщепляли эндонуклеазой рестрикции, которая давала липкие концы. Полученные фрагменты денатурировали и гибридизовали с 200-кратным избытком денатурированной ДНК, взятой от пациента «с делецией» и подвергнутой «озвучиванию» (обработке ультразвуком) для получения случайным образом разорванных фрагментов. В этих условиях Хр21 ДНК, присутствующая в организме нормальных индивидуумов, но отсутствующая у пациентов с делецией, будет гибридизоваться сама с собой и будет единственной ДНК с липкими концами, пригодными для клонирования в векторе.

Клонированная ДНК, выделенная, как описано выше, была использована в качестве зонда в гибридизации по Саузерну с образцами ДНК здорового и больного индивидуумов с целью идентификации тех образцов, которые несут ген *DMD*. Один из шести фрагментов, принадлежащих району Хр21, выявил делеции у части пациентов с МДД, и как показало обследование семей, был жестко сцеплен с болезнью. Из этого района был выделен участок длиной около 200 тыс. п. н., и не содержащая повторов ДНК была идентифицирована путем гибридизации с ДНК курицы, грызунов и приматов. Основная идея этого метода, называемого «зоо-блоттингом», заключается в том, что кодирующие последовательности сохраняются в процессе эволюции, а не кодирующие — нет. Конкретный район гибридизовали в жестких условиях с ДНК других организмов, и секвенирование позволило обнаружить экзон, ограниченный с двух сторон сигналами сплайсинга. Зонд, полученный на основе этого участка, позволил детектировать протяженную РНК в мышце человеческого зародыша, которая отсутствует в других тканях. Антисыворотка, полученная против продуктов экспрессии частей гена, взаимодействовала с белком (дистрофином), присутствующим в мышце нормального взрослого организма и зародыша, но отсутствующим у пациентов с МДД.

Идентификация гена дистрофина позиционным клонированием показывает, как неохарактеризованный признак может анализироваться таким образом, что сначала ведут поиск гена, а затем возвращаются к его продукту (обратная генетика). Это также демонстрирует, как для достижения успеха следует объединять возможности обычной генетики, технологии рекомбинантных ДНК, секвенирования и биохимического анализа. Позиционное клонирование обладает рядом недостатков. Во-первых, оно очень затруднено практически, и для достижения значительных успехов необходимы объединенные усилия больших групп. Во-вторых, очень нелегко связать интересующий признак (например, муковисцидоз) с небольшим районом хромосомы, если он не сцеплен с какой-нибудь явной хромосомной аномалией. При позиционном клонировании гена муковисцидоза опирались на явление неравновесных сцеплений, описанное далее в этой главе в связи с картированием полигенных болезней (см. с. 135).

Метод генов-кандидатов

В отличие от позиционного клонирования метод генов-кандидатов не требует изоляции новых генов, а опирается на уже имеющуюся информацию о функции и локализации ранее изолированных генов. Пример этого подхода — впервые проведенный анализ наследственного заболевания глаз, пигментный ретинит (ПР). Вызывающие ПР дефекты картируются в различных участках хромосом, но в каждом случае фенотипически это проявляется в виде дегенерации фоторецепторов. У одной большой родословной ген ПР был картирован на большом плече хромосомы 3. Интересно, что ген белка фоторецептора родопсина также картирован в этом районе. Это дает основание предполагать, что мутации в гене родопсина могут являться причиной тех случаев ПР, которые картируются в хромосоме 3, и секвенирование гена из больных индивидуумов показало наличие однонуклеотидной замены. Как и ожидалось, индивидуумы с ПР, связанной с другими хромосомными локализациями, не имеют мутаций в родопсине.

Развитию метода генов-кандидатов для идентификации и характеристики гена способствовали проекты по секвенированию геномов, а также достижения в области биоинформатики. Например, после полного секвенирования генома человека многие гены в последовательности были идентифицированы. Теперь ключевая задача — установить функцию идентифицированных генов. Для осуществления этого используют такой подход: последовательность каждого гена переводят в соответствующую белковую последовательность, а затем в биоинформатических базах данных осуществляют поиск похожих (родственных) белков, функция которых известна. Когда информация о функции гена собрана, ее можно использовать для анализа дефектов гена. Например, если установлена связь между новым признаком и специфическим районом на карте, то в базе данных по геному запрашивается информация о генах, локализованных в том же районе. Функции этих генов сравниваются с особенностями фенотипического признака с целью выявления наиболее подходящего гена-кандидата. Потенциальный ген из индивидуумов, обладающих этим признаком, может быть проанализирован секвенированием или гибридизацией с целью установления в нем секвенсных аномалий. Расшифровка последовательности генома мыши существенно облегчает эти исследования (дополнение 4-2).

4-2 Последовательность генома мыши и ее значимость для изучения болезней человека

Последовательность генома мыши была опубликована в декабре 2002 г. Она способна облегчить поиск и биохимический анализ генов, ответственных за болезни человека. Этому существует несколько причин. Во-первых, что очень важно, геном мыши имеет такое же число генов, как и геном человека,

причем 99% этих генов, по-видимому, идентичны, а 96% расположены в том же порядке. Это означает, что гены болезней, идентифицированные у мыши, могут быть перенесены на генную карту человека. Во-вторых, линии мышей, используемые в лабораторных экспериментах, являются инбредными (гене-

тически чистыми), в то время как в человеческих популяциях чистых линий не существует. Даже при исследовании семей в пределах большой родословной каждая хромосома в паре имеет свое происхождение, а у (инбредных) мышей хромосомы в парах идентичны. В третьих, можно провести экспериментальные скрещивания между мышами с различными признаками, а затем очень быстро начать изучение полученного потомства. В-четвертых, можно получить мутантных мышей с определенными генными дефектами, фенотип которых можно потом изучать. Все перечисленные пункты будут конкретизированы ниже.

Известно более 1000 спонтанных и индуцированных радиацией мышей-мутантов, вызывающих менделевское наследование фенотипов. В основном благодаря позиционному клонированию молекулярные дефекты в настоящее время известны приблизительно для 200 из указанных мутантов. Наличие аннотированной последовательности генома мыши должно повысить эффективность этой работы, так как появится возможность перейти от генетического картирования к идентификации генов-кандидатов. Последовательность генома мыши станет ключевым звеном при работе с растущим разнообразием мышей-мутантов, получаемых химическим мутагенезом. В специально организованных 10 научных центрах ведутся исследования по мутагенезу с целью выявления доминантных и рецессивных мутаций, соответствующих различным клинически значимым фенотипам. Для каждого мутанта идентификация молекулярного дефекта требует позиционного клонирования.

Наличие более 50 инбредных линий мышей, каждая со своим собственным фенотипом, соответствующим разнообразным количественным признакам, позволяет картировать гены, ответственные за комплексные генетические заболевания. В настоящее время ведутся систематические исследования, в которых определяются такие параметры, как вес тела, поведенческие характеристики и предрасположенность к болезням у стандартного набора инбредных линий. Соответствующие скрещивания между такими линиями с последующим генотипированием позволят картировать такие сложные признаки. Использование последовательности генома мыши в качестве основы позволит упростить процедуру позиционного клонирования этих признаков.

За последние годы было получено большое количество мышей-мутантов, у которых мутации, вызывающие потерю или приобретение какой-либо функции, находились в специфических генах, представляющих интерес с точки зрения биологии или медицины. Эти так называемые «нокаут»- или «нокин»-мутанты были сконструированы методами генной инженерии с использованием эмбриональных стволовых клеток (с. 251). Расшифровка последовательности генома мыши существенно облегчает создание таких мутантов, так как должно упроститься планирование эксперимента. Кроме того, не все мышинные модели воспроизводят человеческий фенотип необходимым образом. Наличие полных последовательностей геномов человека и мыши дает возможность предусмотреть эти различия. Например, может оказаться, что мутация гена мыши будет получена вовсе не в гене, гомологичном гену человека. Такое может произойти, когда существует несколько генов с очень сходными функциями. С другой стороны, геном человека может содержать только один-единственный ген в семействе, в то время как геном мыши может содержать множество генов в семействе с перекрывающимися биохимическими свойствами.

Следует остерегаться двух вещей. Во-первых, некоторые мутации в генах человека были идентифицированы как причины определенных болезней. Когда последовательность генома мыши была проанализирована, обнаружилось 160 подобных мутаций у мышей, которые фенотипически были нормальными. Почему такое может происходить, не совсем ясно, но здесь очень помогло бы понимание причин возникновения различий между организмами. Во-вторых, в геноме мыши наблюдается значительное увеличение размеров семейств генов по сравнению с семействами генов человека. Такое явление наблюдается в первую очередь в семействах генов, связанных с воспроизводством, иммунитетом, обонянием и реакцией на ксенобиотики, что на самом деле не вызывает удивления, если принять во внимание ареалы обитания и образ жизни мышей. Для фармацевтической индустрии очень важно расширение семейства генов цитохрома P450, поскольку это означает, что мыши и люди могут по-разному реагировать на лекарства.

Анализ полигенных болезней

В то время как в основе анализа моногенных заболеваний лежит обычное картирование с учетом менделевских принципов наследования, такой подход практически непригоден для анализа сложных полигенных болезней. Участие множества генов и сильное влияние факторов внешней среды подразумевают, что большие родословные с множеством поколений (пригодные для изучения полигенного заболевания) должны встречаться крайне редко. Следовательно, необходимы другие методы картирования, и два из них в настоящее время широко используются. Это **безмодельный (непараметрический) метод анализа сцеплений** и **метод ассоциации** (или картирование неравновесных сцеплений).

Безмодельный (непараметрический) анализ сцеплений

Безмодельные методы не принимают во внимание наследственные паттерны, число участвующих локусов или роль внешних факторов. Напротив, они базируются только на том принципе, что два больных родственника имеют общие аллели, определяющие предрасположенность к болезни. Следовательно, изучается анамнез семьи, где оба родителя и, по крайней мере, два ребенка (сibs, родные братья и сестры) болеют исследуемой болезнью. Такие семьи называют ядерными; принцип проводимого анализа показан на рис. 4-7. Допустим, что определенный рай-

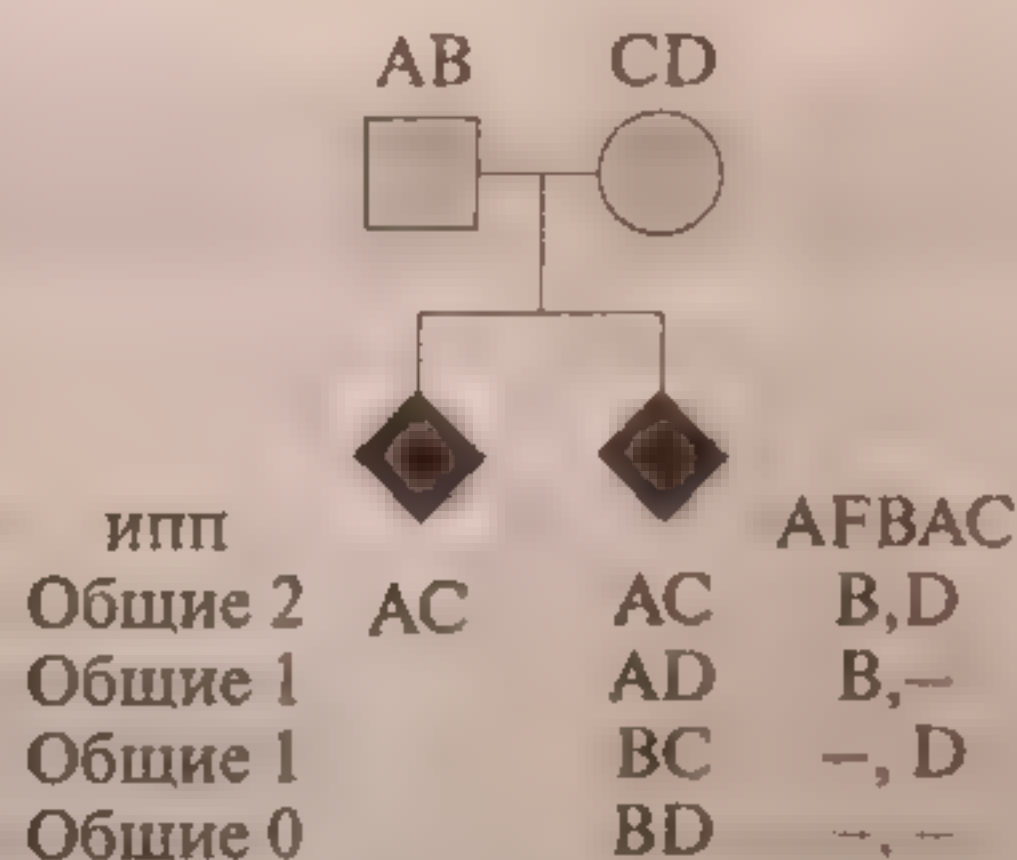


Рис. 4-7 Семьи с сиб-парами. Показана родословная ядерной семьи, где отец (серый квадрат) и мать (серый круг) находятся в первом ряду, а два больных ребенка любого пола (черные ромбы) — во втором ряду. Предположим для простоты, что в исследуемом районе генома мы можем различать все 4 родительских аллеля, обозначенных A, B, C и D, причем родительские аллели расположены так, что A и C передались от отца и матери первому больному ребенку. Возможны четыре конфигурации у двух потомков в отношении унаследованных от родителей аллелей: у обоих потомков могут быть одинаковые родительские аллели (A и C); может быть общий аллель от отца (A) и различающиеся аллели от матери (C и D); может быть общий аллель от матери (C), но различные аллели, полученные от отца (A и B); может не быть общих родительских аллелей. Эти четыре конфигурации одинаково вероятны, если нет влияния исследуемого генетического района на болезнь. Родительские аллели, которые никогда не передавались больной сиб-паре в каждой семье, используются как контроль популяции при изучении ассоциаций с использованием данных ядерной семьи, так называемый контроль, основанный на анализе больной семьи (AFBAC, affected family-based control).

он генома связан с состоянием болезни и что мы можем различить четыре родительские хромосомы (A, B, C, D). Если анализируемый район не содержит ген предрасположенности к болезни, то вероятность, что два больных ребенка имеют два, один или ноль (ни одного) одинаковых районов родительских хромосом, составляют 25, 50 или 25% соответственно. С другой стороны, отклонения от такого случайного менделевского (математического) ожидания указывают на то, что больные дети имеют хромосомные участки, которые **идентичны по происхождению** (ипп, или *англ. ibd*), что предполагает присутствие генов предрасположенности к исследуемой болезни.

Физические маркеры, в частности микросателлиты, идеальны для выявления хромосомных районов, произошедших от каждого из родителей, так как они высокополиморфны и разбросаны по всему геному. На практике ДНК больных братьев и/или сестер систематически анализируется с использованием большого числа физических маркеров, расположенных вдоль всего генома, т. е. геном сканируется. Цель — найти районы, которые обнаруживают гораздо большее сходство у двух сибсов, чем это можно было бы ожидать на основе чистой случайности. Первая комплексная (сложная, мультифакториальная) болезнь, проанализированная таким путем, — диабет I типа, при этом было обнаружено сцепление с главным комплексом гистосовместимости (дополнение 4-3). С тех пор метод был распространен на другие комплексные болезни и локусы количественного признака, определяющего рост взрослого человека.

Дополнение 4-3 Связь между диабетом I типа и ГКГ

Существует два типа диабета: юношеский, или инсулинзависимый (тип I) и диабет взрослых, инсулиннезависимый (тип II). Диабет I типа имеет частоту встречаемости 0,5% среди европеоидов и является результатом аутоиммунной деструкции (разрушения) клеток поджелудочной железы, продуцирующих инсулин. Генетические факторы сами по себе не вызывают диабет I типа, так как, если один близнец из идентичной пары заболевает, существует только 40%-ная вероятность, что второй близнец также станет диабетиком. Тем не менее строго доказателно участие генетических факторов и, как отмечено на с. 141, первые исследования с помощью метода безмодельного анализа комплексной болезни позволили установить связь между диабетом I типа с локусом ГКГ. Особенно склонны к заболеванию диабетом индивидуумы, гетерозиготные по HLA-DR3 или HLA-DR4. Это согласуется с концепцией, что диабет I типа

является аутоиммунной болезнью, так как DR3 и DR4 находятся в локусе, который регулирует иммунный ответ.

Следующий шаг к пониманию механизма возникновения диабета I типа был сделан с помощью молекулярного анализа генов HLA-DQ. Наличие аспарагиновой кислоты в положении 57 DQβ-цепи тесно связано (ассоциировано) с устойчивостью к диабету I типа, в то время как другие аминокислоты в этом положении вызывают предрасположенность к заболеванию. Около 95% пациентов с диабетом I типа гомозиготны по DQβ-генам, у которых в положении 57 не закодирована аспарагиновая кислота. Поскольку положение 57 β-цепи является критическим для связывания антигена и доставки его к Т-клеткам, то замены аминокислоты в этой позиции могут играть роль в развитии аутоиммунного ответа, который разрушает инсулин-продуцирующие клетки.

Картирование неравновесных сцеплений

При анализе ассоциаций или неравновесных сцеплений (НС) (ассоциативное картирование) сравнивают частоты маркеров в неродственных случаях и контрольных группах и анализируют одновременную встречаемость маркера и болезни на уровне популяции. Заметная ассоциация между маркером и болезнью может подразумевать участие гена-кандидата в этиологии (происхождении) болезни. С другой стороны, ассоциация может быть вызвана НС маркерного аллеля с геном предрасположенности к болезни. НС означает близкое физическое сцепление маркера и гена болезни. Как можно ожидать, НС не будет стабильно в течение длительных периодов времени из-за явления мейотической рекомбинации. Таким образом, степень НС снижается пропорционально числу поколений, появившихся с момента появления НС. Кроме того, чем ближе расположены два маркера, тем дольше НС будет персистировать в популяции.

Исследование болезни Крона (деструктивного воспалительного заболевания кишечника) показывает, как НС может быть использовано для картирования локусов болезни (рис. 4-8). Обычный анализ сцеплений вы-

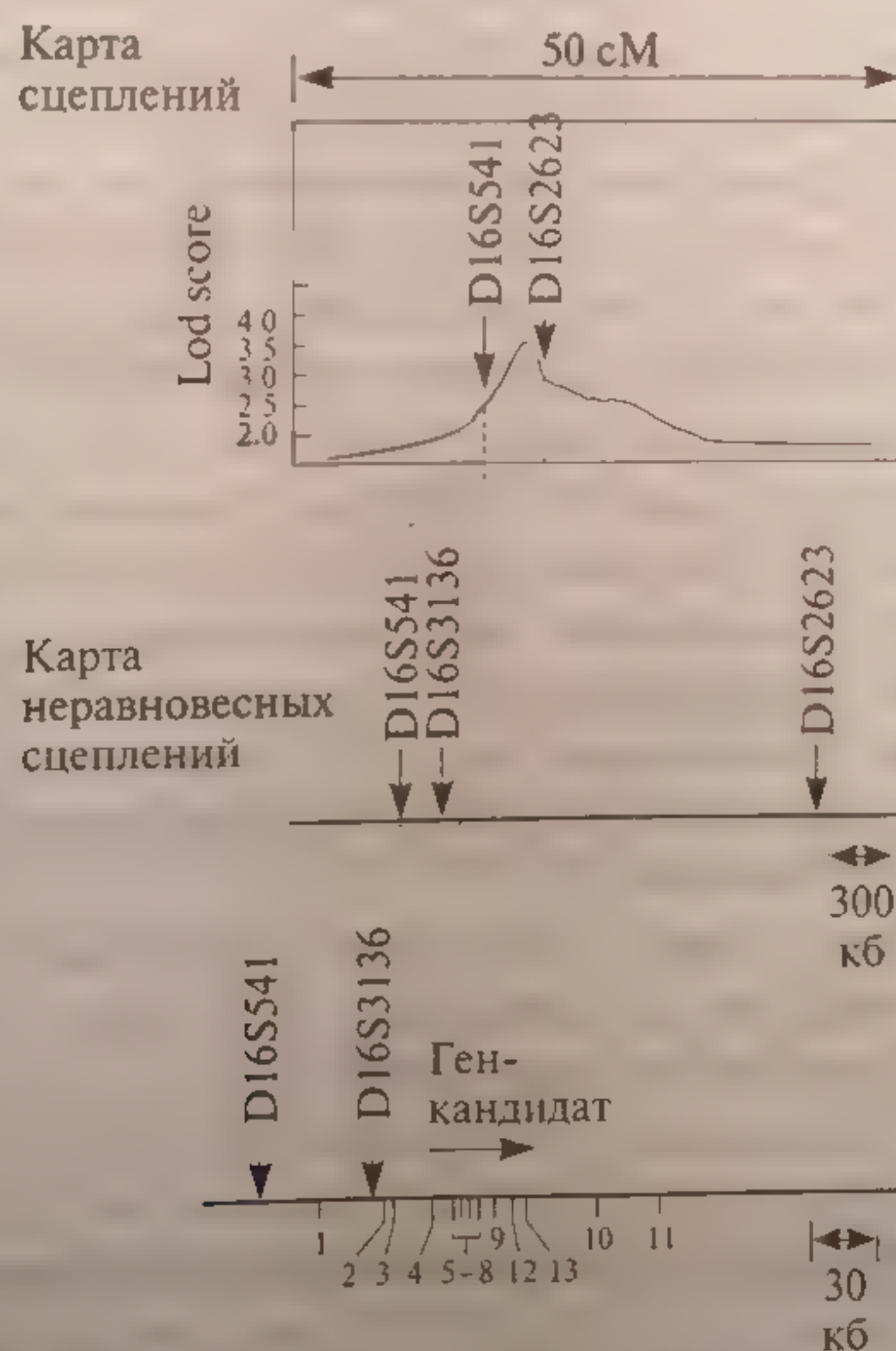


Рис. 4-8 Картирование локуса на хромосоме 16, ассоциированного с болезнью Крона. Цифры, расположенные вдоль нижней линии, соответствуют ОНП (SNP), использованным для точного картирования. Все ОНП (SNP), за исключением 10 и 11, обнаруживают тесное сцепление (см. подробности в тексте).

явил локус восприимчивости на хромосоме 16. С помощью 26 микросателлитных маркеров локус был картирован в районе 5Мб между маркерами D16S541 и D16S2623. Анализ НС показал слабую ассоциацию болезни Крона с D16S3136, который лежит между двумя другими маркерами. Участок длиной 260 тыс. п. н. в районе маркера D16S3136 был секвенирован, но только один охарактеризованный ген был выявлен, и он, по-видимому, не является кандидатом. Секвенирование также выявило 11 ОНП (SNP), и три из них обнаруживали сильное НС с болезнью Крона в 235 больных семьях, что указывало на близкое расположение локуса восприимчивости. Им оказался локус *NOD2*. Кроме того, обнаружилось, что некоторые из SNP (ОНП), использованные в настоящем исследовании, являются причинными мутациями. Тем не менее следует отметить, что локус *NOD2* способствует восприимчивости, но не является причиной болезни. Другие хромосомные локусы связаны с болезнью Крона, но число участвующих генов, а также характер их взаимодействий, приводящих к развитию болезни, неизвестны.

Гаплотипы

Сочетание ОНП (SNPs) на участке ДНК называют гаплотипом. На рис. 4-9 показана эволюция ряда теоретических гаплотипов, некоторые из них включают ОНП, вызывающий болезнь; ясно, что не все ОНП приводят к болезни. Кроме того, информативны не все гаплотипы, и их детекция в исследованиях ассоциаций НС могут затруднить интерпретацию данных. Именно это было обнаружено при описанном выше исследовании болезни Крона. Тем не менее, когда все ОНП в определенном районе хромосомы анализировались в большой группе неродственных индивидуумов, результаты показали картину дискретных гаплотипных блоков размером от 10 до 100 тыс. п. н., каждый с ограниченной вариабельностью, но перемежающиеся ярковыраженными сайтами рекомбинации. Существование гаплотипных блоков заметно упростило анализ НС. Вместо того, чтобы использовать все ОНП в районе, мы можем точно идентифицировать, какие ОНП лишние, а какие будут информативными в исследованиях ассоциаций.

Идентификация гаплотипов находит множество применений в медицинской практике, но только два из них будут здесь рассмотрены: HLA-гаплотипы и реакции на лекарства.

Главный комплекс гистосовместимости

Организмы высших животных, включая человека, способны находить разницу между «свой» и «чужой» и обеспечивать ответную реакцию на очень широкий спектр чужих антигенов. Эта реакция называется иммунным ответом. Генетические факторы играют ключевую роль в формирова-

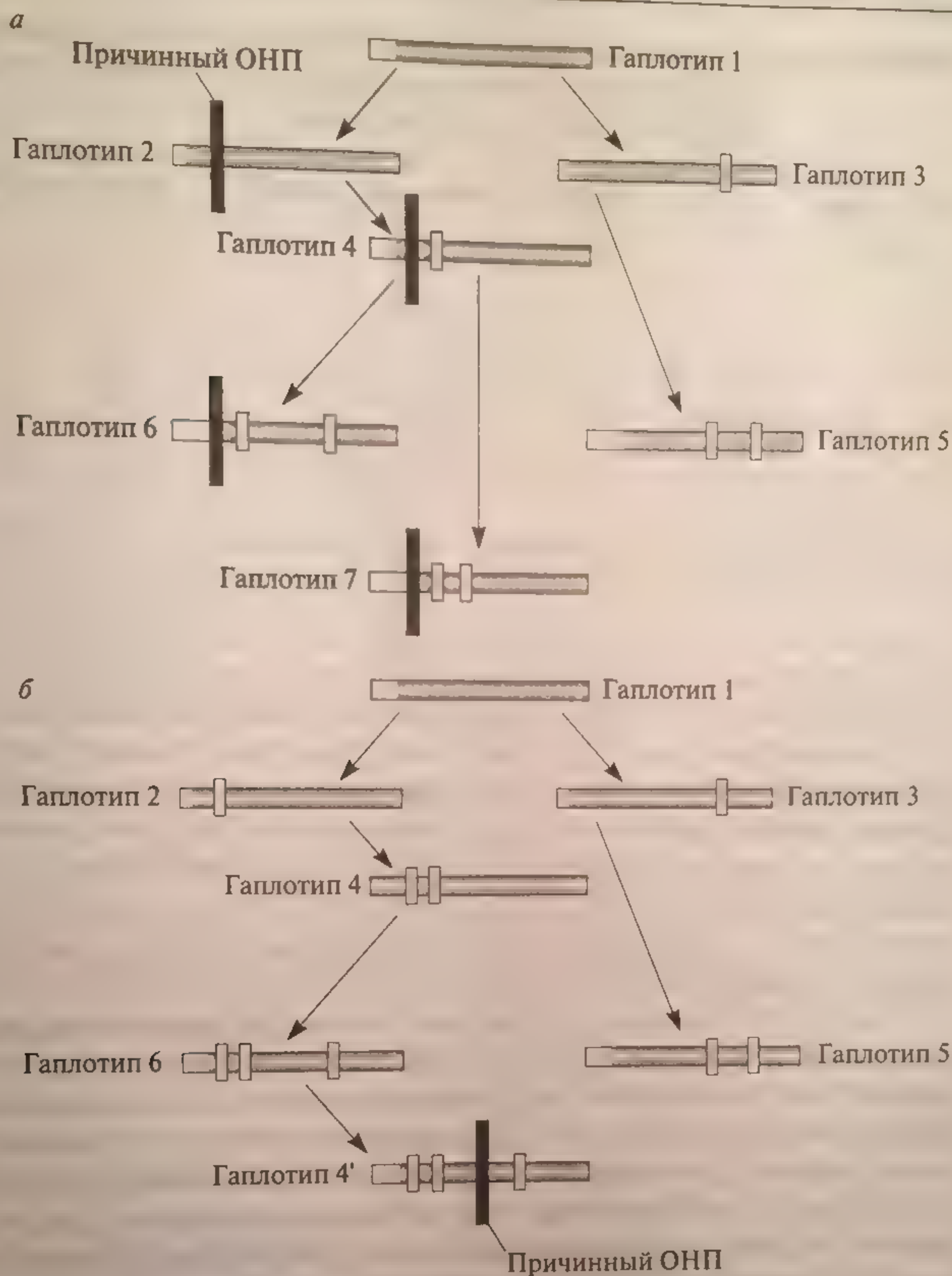


Рис. 4-9 Два пути возникновения ассоциаций между причинным однонуклеотидным полиморфизмом (ОНП) и конкретным гаплотипом. а — причинный ОНП возникает раньше; б — позже.

нии нормального иммунного ответа и неправильных (как результат мутаций) реакций, включая иммунодефицит и аутоиммунное заболевание. В развитии и функционировании иммунной системы играет роль множество генов, но здесь будут рассмотрены только те, что формируют главный комплекс гистосовместимости (ГКГ).

ГКГ состоит из большого кластера генов, расположенных на коротком плече хромосомы 6. По принципу структурных и функциональных различий эти гены делятся на три класса, каждый из которых чрезвычайно сложен и полиморфен. Два из трех классов соответствуют генам антигенов

Таблица 4-3 Вариации белков и ДНК в локусах HLA. Из-за вырожденности генетического кода возможно существование большего числа вариантов ДНК, чем для белков

HLA-локус	Варианты антигенов (число)	Варианты ДНК (число)
HLA-A	25	83
HLA-B	53	186
HLA-C	11	42
HLA-DR (только β -цепь)	20	221
HLA-DQ (цепи α и β)	9	49
HLA-DP (цепи α и β)	6	88

человеческих лейкоцитов (human leukocyte antigens, HLA), которые представляют собой поверхностные белки клеток. Эти антигены очень важны для нормального функционирования иммунной системы и были впервые обнаружены при попытках трансплантации тканей между неродственными индивидуумами. Класс I антигенов состоит из двух полипептидных единиц, полиморфного пептида, кодируемого ГКГ, и инвариантного полипептида, кодируемого геном вне ГКГ. Молекулы класса II — гетеродимеры субъединиц α и β , обе кодируются ГКГ. Гены класса III не являются генами HLA, но включают гены полиморфных белков сыворотки и мембранных рецепторов.

Система HLA включает большое количество генов и чрезвычайно полиморфна, причем множество антигенных вариантов расположены в различных локусах (табл. 4-3). Поскольку аллели HLA так тесно сцеплены, они переносятся вместе в виде гаплотипов. Каждый индивидуум имеет два гаплотипа, по одному на каждой копии хромосомы 6, и аллели кодоминантны. Каждый ребенок получает один гаплотип от каждого родителя (рис. 4-10), и существует вероятность в 25%, что два ребенка с одними и теми же родителями унаследуют одинаковые (matching) HLA-гаплотипы. Поскольку успех трансплантации тканей сильно зависит от степени сходства между HLA-гаплотипами, предпочтительными донорами для пересадки костного мозга или органа для трансплантации являются брат или сестра, имеющие идентичный HLA-гаплотип.

По мере накопления информации о генах HLA становится ясно, что существует ассоциация (связь) между специфическими HLA-генами, или гаплотипами, и определенными болезнями. Например, при исследовании одной нации только 9% популяции имели аллель HLA-B27, но он присутствовал у 95% больных хроническим воспалительным заболеванием — анкилозирующим спондилоартритом. Аналогичным образом, 28% популяции содержали аллель HLA-DQ2, однако он присутствовал у 99% больных глютеновой болезнью. Маловероятно, что только гены HLA ответственны за специфические болезни. Скорее, они способствуют предрасположен-

А
А1
B8
CW1
DW6
DR2

Рис. 4-10
казано, ка
комбинан

ности К
ми. Нап
витель
агента
ней, Н

Индиви
(фарма

С
ства
лек
лее
ско
ис
на
го
л
л

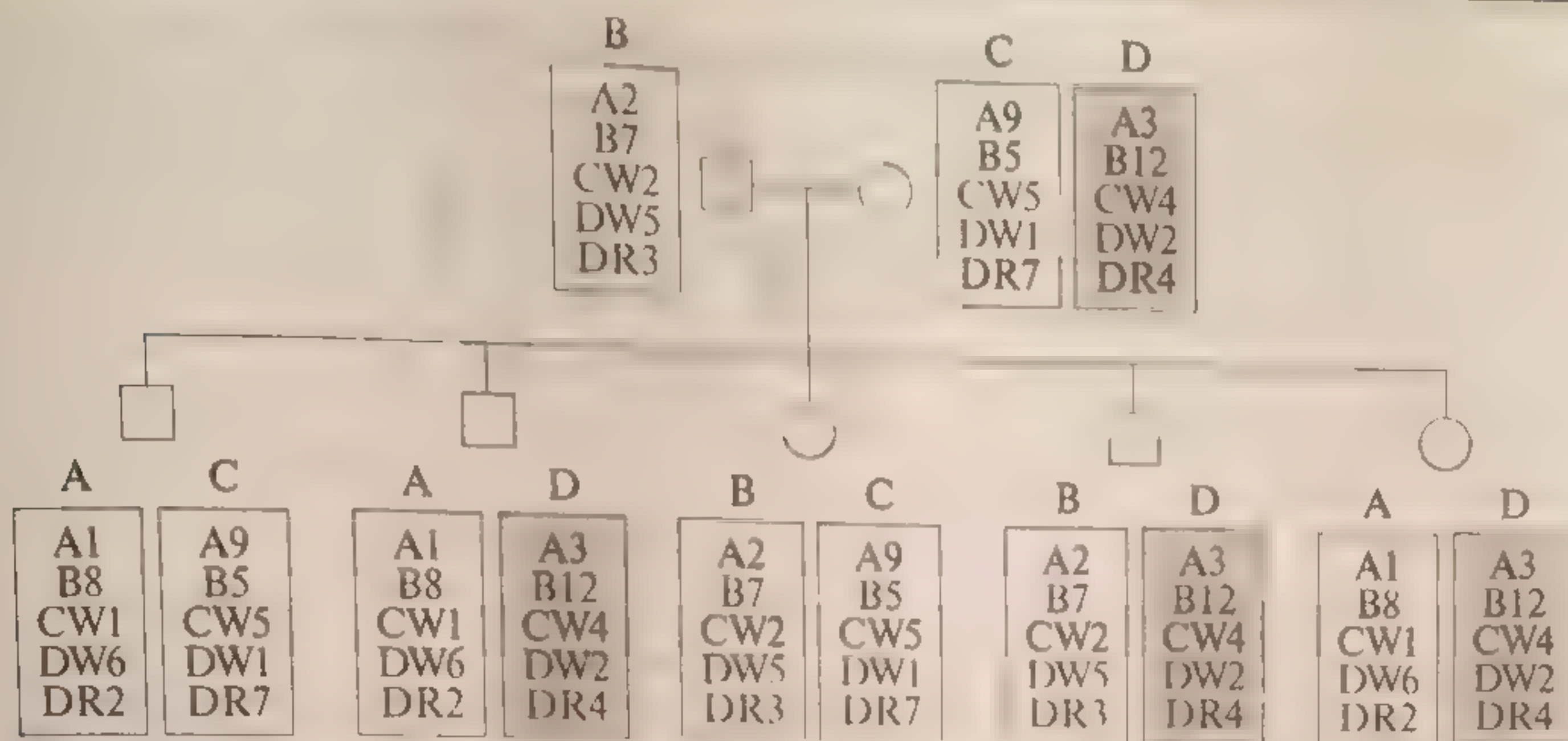


Рис. 4-10 Наследование HLA-гаплогенов. Обычно гаплоген передается, как здесь и показано, как единое целое. В чрезвычайно редких случаях родитель передает ребенку рекомбинантный гаплоген.

ности к болезням наряду с другими генетическими и внешними факторами. Например, как указано на с. 97, они, по-видимому, влияют на чувствительность различных индивидуумов к определенным инфекционным агентам. Кроме того, могут играть роль в развитии комплексных болезней, например диабета I типа (дополнение 4-3).

Индивидуальные реакции на лекарства (фармакогеномика)

Существует две основные причины индивидуальной реакции на лекарства: вариация в структуре молекулы-мишени и различия в метаболизме лекарства. Например, агонисты β_2 -адренергических рецепторов — наиболее широко используемые агенты при лечении астмы; было описано несколько полиморфизмов внутри генов указанных мишеней лекарств. Ряд исследований показал, что существуют ассоциации между ОНП в этих генах и ответом на терапию. В одном из исследований было показано, что гомозиготы по одному аллелю в 5,3 раза более чувствительны к альбутеролу, чем гомозиготы по альтернативному аллелю. Гетерозиготы в 2,3 раза лучше переносят прием альбутерола.

Многие неблагоприятные реакции на лекарства возникают из-за неспособности их метаболизировать. Приведем пример: среди популяции европеоидов от 3 до 10% не способны метаболизировать адреноблокатор дебризохин, и лечение им приводит к тяжелой гипотензии. У афро-американцев частота подобных «слабых метаболизаторов» составляет 5%, а у азиатов — всего лишь 1%. Подверженные этому индивидуумы гомозиготны по мутантному гену цитохрома P450 (*CYP2D6*) и также не способны метаболизировать более 20% всех обычно прописываемых лекарств, включая кодеин. Этот же ген имеет аллели, вызывающие фенотип «быст-

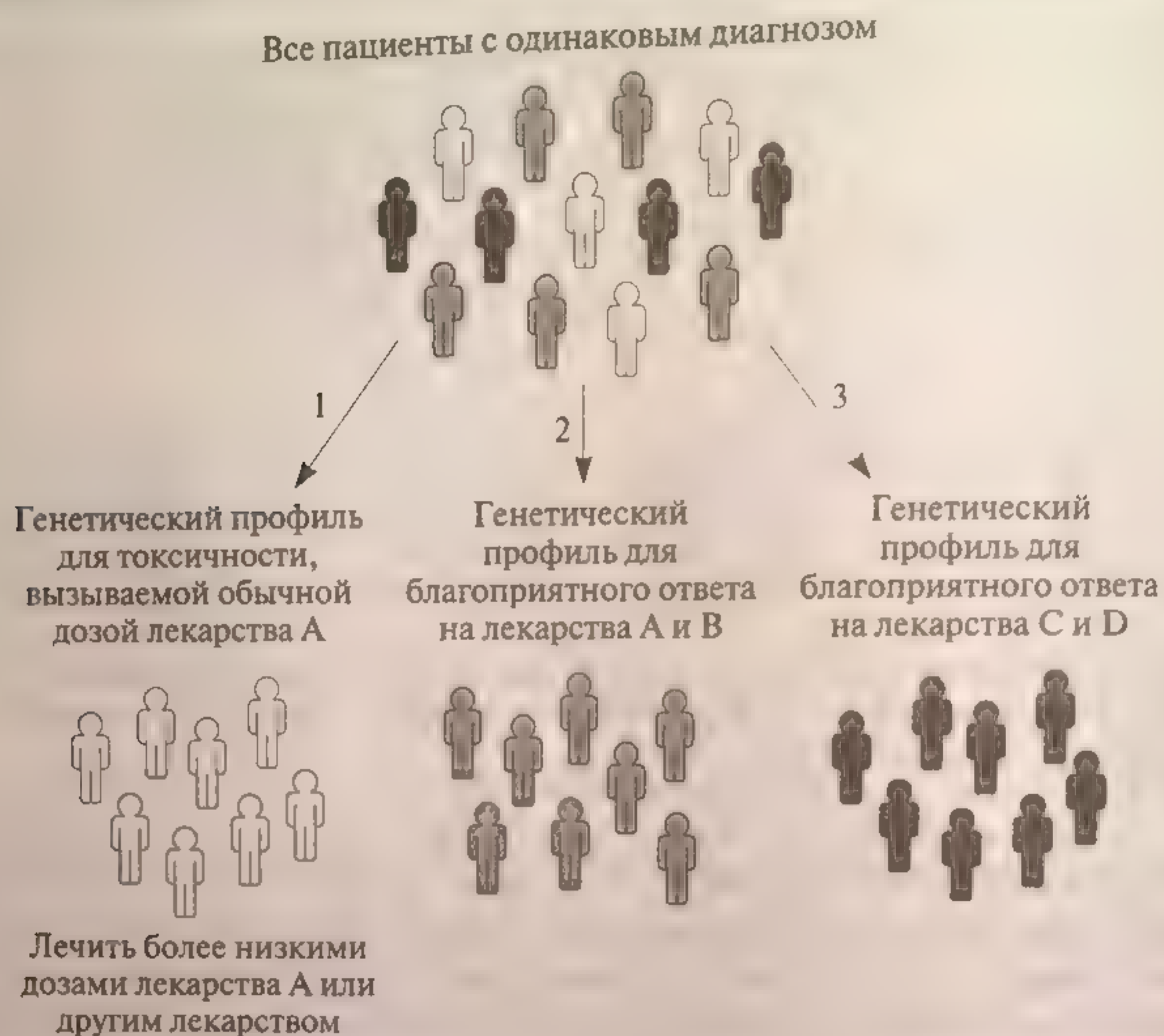


Рис. 4-11 Фармакогеномика дает возможность подразделить популяцию пациентов с одним и тем же эмпирическим диагнозом (например, гипертония) на подгруппы, которые унаследовали различия в метаболизме и/или чувствительности к определенным лекарствам. Одна подгруппа в популяции может подвергаться существенному риску развития острой интоксикации (1), в то время как у других подгрупп может существовать полиморфизм рецепторов или полиморфизм проявлений болезни, которые делают этих больных более восприимчивыми к различным видам терапии (2 против 3).

рого метаболизатора», что коррелирует с повышенной предрасположенностью к раку.

Для многих генетических полиморфизмов, связанных с действием лекарственных препаратов, не существует ярко выраженного фенотипа, проявляющегося в отсутствие лекарств. Это вносит нежелательный элемент непредсказуемости при выборе подходящих видов терапии для больных и при подборе пациентов для клинических исследований новых препаратов. В обоих случаях цена последствий слишком высока. Если бы генотип индивидуума был известен заранее, то можно было бы принять лучшее клиническое решение. Поскольку многие из полиморфизмов, вызывающих нежелательные реакции, представляют собой однонуклеотидные замены, то профиль ОНП индивидуума можно было бы использовать при выборе терапии или при отборе пациента для участия в клинических испытаниях. Если размер генома человека составляет $3 \cdot 10^9$ п. н., а ОНП встречаются в среднем через каждые 1000 нуклеотидов, то в геноме человека существует более 3 млн. ОНП. Типирование индивидуума по всем ОНП — это гигантская

работа, тем более если ее пришлось бы повторять много раз. Однако существование гаплотипов делает задачу типирования индивидуальных реакций менее объемной, но все равно трудной! Из-за высокой стоимости (сотни млн. долларов) клинических испытаний нового лекарства, особенно если непригодность лекарства обнаруживается на последних стадиях, фармацевтические компании заинтересованы в разработке высокоавтоматизированных высокопроизводительных методов профилирования ОНП. Сначала появится лучшая классификация различных подтипов болезни и, следовательно, более правильный диагноз. Это в свою очередь облегчит выбор наиболее подходящего терапии. Позже, когда мы будем знать точную причину каждой болезни, появится возможность разрабатывать лекарства, способные лечить причину болезни, а не симптомы, как это происходит сейчас. В конце концов, генетический анализ чувствительных к лекарствам больных позволит предложить препараты, которые можно было бы использовать, а фармакогеномный анализ позволит определить, какие лекарства следует использовать (рис. 4-11). Это будет эра персонализированной медицины (дополнение 4-4).

Дополнение 4-4 Социальные и этические проблемы

Возможность скрининга у индивидуумов мутаций, вызывающих либо болезнь, либо предрасположенность к болезни, поднимает ряд социальных и этических проблем. Существуют различные трудности в зависимости от того, проводится скрининг пренатально или постнатально. В случае пренатальной диагностики наследуемых дефектов используют метод, называемый амниоцентез, который позволяет извлечь небольшое количество амниотической жидкости, окружающей плод. Последняя содержит немного клеток (амниоцитов) развивающегося ребенка, и при необходимости их можно размножить культивированием *in vitro*. Клетки затем анализируют на наличие генетических дефектов, и в случае обнаружения какого-либо из них может быть принято решение о проведении аборта. Во многих странах существуют жесткие законы, запрещающие аборт, но даже в тех странах, где они разрешены, моральная сторона вопроса серьезно обсуждается. Если даже согласиться с допустимостью абортов, где следует проводить границу? Если пренатальная диагностика показывает, что развивающийся ребенок будет страдать мусковисцидозом или тяжелым комбинированным иммунодефицитом, то в этом

случае можно принять решение об аборте. Однако предположим, что плод женского пола, и тесты положительны на наличие генов предрасположенности к раку *BRCA1* и *BRCA2*. Эти мутации увеличивают риск того, что у носителя разовьется рак, но нет полных гарантий, что рак возникнет. Должен ли плод быть удален из-за такого риска? Еще один пример: допустим, что можно будет показать, что ген или группа генов приводят к гомосексуальности (такое предположение было высказано несколько лет назад). Будет ли это правильно со стороны гетеросексуальных индивидуумов противостоять гомосексуальности и удалять плод, имеющий риск стать гомосексуалом?

Главная проблема, возникающая в результате постнатальной генетической диагностики, — это генетическая дискриминация, которая выражается в отказе страхования или медицинского обслуживания людей с определенным набором генов. В США афро-американцы довольно долго подвергались дискриминации при приеме на работу. Поскольку у афро-американцев высокая частота встречаемости серповидноклеточной анемии, при приеме на работу у них требовали доказательства отсутствия этого заболевания. Аналогично носителям мутации,

вызывающей серповидноклеточную анемию, (т. е. гетерозиготным индивидуумам), запрещено было быть пилотами в воздушных силах США на том основании, что на больших высотах они не смогут справиться с пониженным давлением кислорода. Такая дискриминация противоречит законам о расовом предубеждении, но принятые недавно новые законы, запрещающие генетическую дискриминацию, предусматривают эти случаи.

До введения законов, запрещающих генетическую дискриминацию, компании, занимающиеся страхованием здоровья, отказывались предоставлять страховку индивидуумам, у которых после генетического тестирования был обнаружен генетический дефект. Действительно, многие страховые компании специально спрашивают у претендентов, проходили ли они когда-либо генетическое тестирование, и если да, то каковы были результаты. Неспособность предоставить такую информацию служила основанием для отказа от предоставления страховки. В данном случае затрагиваются проблемы конфиденциальности и закрытости генетической информации индивидуума, а также возникающие в связи с этой информацией экономические и правовые вопросы. Следует отметить, что во многих странах военные должны предоставлять образец ДНК для облегчения идентификации сильно искаверканных тел в случае вооруженных конфликтов или других бедствий. Такие образцы ДНК могут быть использованы для генетического тестирования без разрешения донора, хотя это и запрещено в большинстве стран законами, контролирующими секретность генетической информации. Кроме того, в некоторых странах создаются базы данных ДНК осужденных преступников, что также может быть использовано для генетических тестов.

Большинство генетических тестов проводится клиническими генетиками, работающими в обычной системе здравоохранения. Однако некоторые частные компании предоставляют услуги по генетическому тестированию непосредственно потребителям, и такие анализы вызывают беспокойство. Во-первых, многие из этих компаний не информируют о конфиденциальности или не предупреждают о риске генетической дис-

криминации. Во-вторых, потребитель может неправильно интерпретировать полученную в результате тестирования информацию. Гены *BRCA1* и *BRCA2* являются хорошим примером этой проблемы. Эти гены кодируют супрессоры опухолевого роста, препятствующие неконтролируемому делению клеток. Если такие гены отсутствуют или изменены, то у тестируемого индивидуума имеется 50%-ная вероятность развития рака груди, и возрастает риск развития рака яичников. Если тестируемая женщина является членом семьи с высоким риском заболевания, т. е. такой семьи, где среди ближайших родственников в следующих друг за другом поколениях было несколько случаев заболевания раком как груди, так яичников, и если эта женщина имеет положительный результат теста, то вероятность, что у нее разовьется рак груди, составляет 90%. В таких случаях профилактическое хирургическое удаление груди и яичников сильно увеличит шансы избежать болезни. Для всех остальных индивидуумов с положительным тестом риск развития рака только слегка выше нормы, но зафиксировано много случаев, когда такие индивидуумы по собственному желанию идут на операцию удаления груди.

Исследующие генетическое тестирование социологи сделали несколько интересных наблюдений. Во-первых, у индивидуумов существует тенденция к разделению на две группы: «беспокоящиеся» и «избегающие». Первые соглашаются с диагнозом, пытаются получить как можно больше информации о болезни и часто становятся политически активными, призывая к увеличению финансирования исследований и здравоохранения. «Избегающие» пользуются всеми средствами, чтобы преуменьшать опасность или даже скрывать наличие нарушений в генах их семьи. Во-вторых, существует очень заметная разница в отношении к данному вопросу у разных полов: мужчины имеют тенденцию избегать, а женщины — беспокоиться. В-третьих, в США афро-американцы и латиноамериканцы гораздо в меньшей степени, чем белые и выходцы из Азии, склонны по собственному желанию подвергнуться генетическому анализу. Возможно, это связано с историей дискриминации индивидуумов, страдающих серповидноклеточной анемией.

Дополнительная литература

POGM: В гл. 2 подробно описываются принципы методов гибридизации с использованием нуклеиновых кислот и различные методы блоттинга (саузерн, нозерн и др.).

POGA: В гл. 6 подробно обсуждается использование методов биоинформатики для идентификации генов по данным секвенирования. В гл. 12 объясняются многие специальные термины, используемые в генетике человека, включая понятие баллов LOD (десятичный логарифм шансов, log of the odds), и есть раздел, посвященный количественным признакам.

Alper JS, Ard C, Asch A, et al. (eds) (2002) *The Double-Edged Helix: Social Implications of Genetics in a Diverse Society*. Johns Hopkins Press, Baltimore.

Две великолепные обзорные статьи, посвященные последствиям генетических вариаций человека, влияющих на восприимчивость к лекарствам:

Johnson JA, Evans WE (2002) Molecular diagnostics as a predictive tool: genetics of drug efficacy and toxicity. *Trends Mol Med* 8, 300–305.

Roden DM, George AL (2002) The genetic basis of variability in drug responses. *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 37–44.

Этот обзор является образцом ясности и четкости на фоне большого количества статей, которые практически недоступны для понимания неспециалистам:

Judson R, Stephens JC, Windemuth A (2000) The predictive power of haplotypes in clinical response. *Pharmacogenomics* 1, 15–26.

Великолепный, понятно написанный учебник, в котором есть разделы, посвященные большинству вопросов, затронутых в данной главе:

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF (2001) *Genetics in Medicine*. WB Saunders, Philadelphia

Великолепный обзор путей установления генетических заболеваний с использованием методов геномики и классической генетики:

Peltonen L, McKusick VA (2001) Dissecting human disease in the postgenomic era. *Science* 291, 1224–1229.

Анализ неравновесных сцеплений в различных популяциях:

Reich DE, Cargill M, Bolk S et al. (2001) Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 411, 199–204.

Статья — подробный обзор всех методов, используемых и предлагаемых для идентификации ОНП;

Twyman RM, Primrose SB (2003) Techniques patents for SNP genotyping. *Pharmacogenomics* 4, 67–79.

Выпуск журнала *Science* от 26 апреля 2002 г. посвящен исследованиям комплексных болезней.

Диагностика и лечение рака

Введение

Рак — общий термин для болезней, включающих аномальную или неконтролируемую пролиферацию (размножение) клеток. Новые клетки, не выполняющие никакой полезной функции в организме, называют **нео-**

Таблица 5-1 Некоторые наиболее распространенные формы рака

Болезнь	Комментарии
Рак легких	Главная причина смертности от рака для обоих полов. Четко просматриваемые связи с курением (активным и пассивным) и действием вредных веществ из окружающей среды, таких как асбест, соединения мышьяка
Рак груди	Вторая из основных причин смертности от рака у женщин (редко у мужчин). Риск увеличивается с возрастом. Семейная предрасположенность
Рак простаты	Вторая из основных причин смертности от рака у мужчин. Риск увеличивается с возрастом
Колоректальный рак	Третья из основных причин смертности от рака у обоих полов. Связь с диетами с высоким содержанием жиров и низким содержанием клетчатки. Семейная предрасположенность
Рак кожи	Существует в виде базально-клеточной карциномы или злокачественной меланомы. Вторая из наиболее распространенных форм рака, возникающих в возрасте до тридцати лет. Возможные причины возникновения: воздействие на кожу химических реагентов, радиация, УФ-облучение
Рак яичников	Возникает в основном у женщин старше 40 лет. Связан с высоким уровнем эстрогенов и недостаточным питанием
Лейкемия	Острые или хронические формы. Вызывается неконтролируемым размножением (пролиферацией) лейкоцитов. Болеют люди со склонностью к геморрагии и персистирующим инфекциям
Цервикальный рак	Возникает в основном у женщин после 30 лет. Повышенный риск связан с курением, ранним первым половым сношением, большим числом половых партнеров и некоторыми болезнями, передающимися половым путем (например, герпес)
Рак яичка	Самый распространенный рак у молодых мужчин

пластическими. В случае большинства форм рака неопластические клетки слипаются воедино, образуя **опухоли**. **Доброкачественные опухоли** содержат клетки, сходные с нормальными клетками, и, поскольку заключены в капсулу из волокон внеклеточного вещества, они остаются локализованными на месте их первичного возникновения. **Злокачественные опухоли**, напротив, содержат аномальные клетки, способные отделяться и перемещаться в другие части тела, давая начало новым опухолям. Такой процесс распространения называется метастазированием, и его трудно контролировать. Поэтому диагностировать и начать лечить рак очень важно как можно раньше.

Существует более 200 различных форм рака у человека, при этом поражены могут быть различные типы тканей и клеток (табл. 5-1). Наилучшее лечение или наиболее эффективная комбинация различных вариантов лечения зависят от специфического типа болезни. Есть три основных класса раковых заболеваний: карциномы, саркомы и гематологические формы рака. **Карциномы** — опухоли, которые возникают из эпителиальных клеток, выстилающих внутренние органы или внешнюю поверхность тела, (т. е. кожи, внутренней поверхности желудка, протоков молочной железы и легких). **Саркомы** возникают из клеток структур опорно-двигательного аппарата тела (т. е. костей, мышц и хрящей). Гематологические типы рака возникают из клеток крови или их предшественников; они включают **лейкемии, лимфомы и миеломы**.

Молекулярные основы рака

В отличие от болезней, которые обсуждались в двух предыдущих главах, рак не наследуется и не является инфекционным заболеванием. Рак — это генетическая болезнь, так как всегда подразумевает изменение ДНК, но он всегда приобретается **соматическими клетками** в процессе жизни индивидуума и не переходит следующему поколению. Наконец, рак возникает из-за мутаций в генах, контролирующих рост и размножение клеток. Одной мутации в одном гене недостаточно, чтобы вызвать рак, поскольку у человека в процессе эволюции была выработана сложная регуляторная система контроля клеточного деления. Она обеспечивает дублирование элементов и устранение неполадок и повышает тем самым надежность работы всей системы в случае, если какие-нибудь компоненты выйдут из строя. Следовательно, рак — это многостадийная болезнь, когда по мере накопления мутаций неопластические клетки постепенно становятся все более аномальными и агрессивными (дополнение 5-1). Спорадический (случайный) рак возникает тогда, когда такие мутации накапливаются в соматических клетках *de novo*, но **предрасположенность** к раку может быть унаследована, если на момент оплодотворения одна или более мутаций уже присутствуют. Следовательно, несмотря на то что некоторые типы рака человека имеют сильную тенденцию поражать семьи, тем не менее сами опухоли не передаются от родителей к потомкам. Большинство форм рака вызыва-

Диаграмма 5-1 Роль накопления мутаций в развитии рака

Эволюция происходит в результате конкуренции, при которой особи, лучше приспособленные к выживанию и воспроизводству, вытесняют другие особи с низкими уровнями приспособляемости и плодовитости. Среди одноклеточных организмов клетки с наибольшей скоростью деления оказываются в наибольшем выигрыше. У многоклеточных организмов конкуренция между клетками подавлена для пользы всего организма в целом. Однако если эта репрессия отменена (как в случае рака), клетки теряют «чувство долга» по отношению к организму и опять ведут себя как эгоистические существа. Поскольку выживание организма гораздо важнее, чем выживание клетки, человеческий род эволюционировал вместе с соответствующими регуляторными механизмами, позволяющими предотвращать рак у большинства людей до тех пор, пока они не выйдут из репродуктивного возраста. Но при эволюционном подходе к проблеме рака следует заметить, что у пожилых людей нет селективного преимущества в защите от рака. Вот почему рак — это в основном возрастная болезнь.

Современные исследования дают основания предполагать, что в клетке должно накопиться, по крайней мере, шесть мутаций,

чтобы вывести из строя регуляторные механизмы и вызвать неконтролируемую пролиферацию. Однако каждая последующая мутация вызывает еще большую степень нарушения регуляции, так что большинство видов рака проходят через характерные стадии дисплазии (небольшая избыточная пролиферация и клеточная дезорганизация), роста доброкачественной опухоли, превращение в злокачественную опухоль и метастазирование. Как в любой развивающейся системе, будут доминировать клетки с наибольшими скоростями пролиферации. Развитие рака, следовательно, включает ступенчатую селекцию клеток, которые становятся все более и более атипичными по мере утраты механизмов контроля за ростом. Вероятность того, что любая клетка приобретет шесть независимых мутаций, очень мала, даже если нормальная скорость возникновения мутаций увеличится под действием факторов окружающей среды. Следовательно, важный компонент развития рака — потеря стабильности ДНК из-за мутаций в генах, участвующих в регуляции репликации и репарации ДНК (см. текст). Особенно хорошо изучено накопление мутаций при развитии колоректального рака (рис. Д5-1).

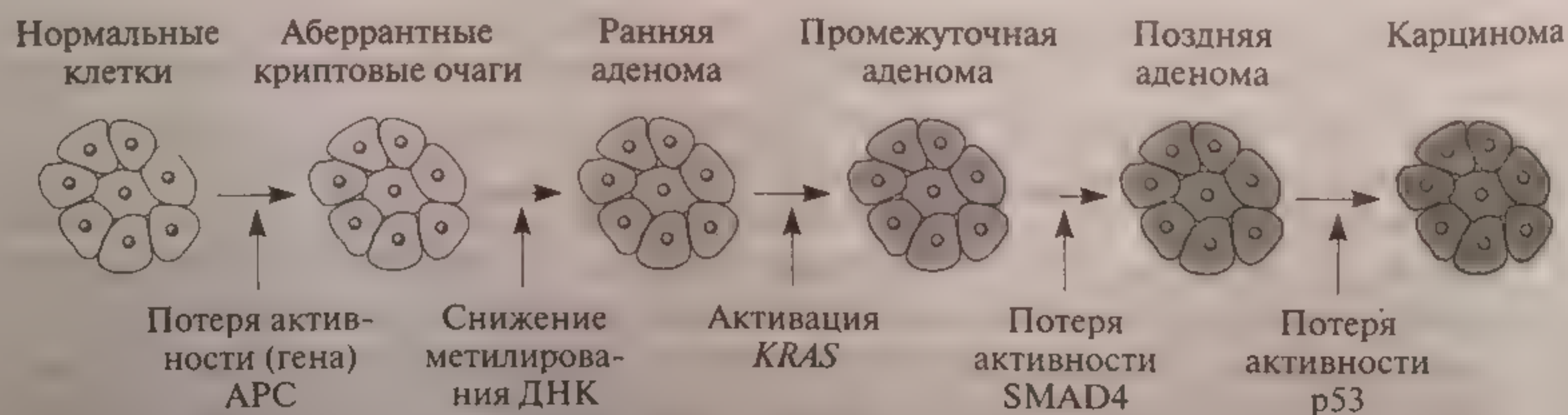


Рис. Д5-1 Накопление мутаций в процессе развития колоректального рака.

ются сложным взаимодействием генетических факторов и факторов окружающей среды, которые либо непосредственно стимулируют пролиферацию клеток, либо увеличивают вероятность возникновения мутаций в соответствующих генах (табл. 5-2).

Генетические процессы, лежащие в основе рака, представлены на рис. 5-1. Можно выделить два важных класса генов, непосредственно содействующих утрате контроля над ростом клеток:

Таблица 5-2 Генетические и внешние факторы, способствующие развитию рака

Фактор	Пример
Генетическая предрасположенность	Некоторые редкие мутации с такой высокой частотой сопровождаются раком, что их часто называют причиной болезни. Например, мутации в гене RB1 почти неминуемо вызывают ретинобластому. Однако в основном предрасположенность к раку вызвана полиморфными вариантами, каждый со своим небольшим кумулятивным эффектом. Эти варианты могут увеличивать общий риск заболевания раком, но другие генетические и внешние факторы также важны.
Пол	У женщин более вероятно развитие рака груди, так как ткань молочной железы у женщин от природы более разросшаяся, чем у мужчин.
Вредные факторы окружающей среды	Асбест, некоторые промышленные химреагенты (например, бензол), большая разовая доза радиоактивного облучения, длительное воздействие радиации низкой интенсивности также могут вызывать повреждения в ДНК, увеличивая риск мутаций. Курение — вредный фактор окружающей среды, являющийся причиной 30% всех смертей от рака, преимущественно рака легких.
Стресс	Длительный стресс, как было показано, способствует развитию некоторых форм рака, хотя механизм неясен.
Пищевые добавки	Нитрат натрия может трансформироваться в мощный канцероген (повреждающий ДНК агент, связанный с раком).
Вирусы	Вирусы иногда увеличивают риск возникновения рака. Например, вирус папилломы человека и вирус герпеса могут способствовать возникновению цервикального рака, поскольку вирусные белки взаимодействуют с человеческими белками, контролирующими клеточную пролиферацию.
Терапия	Эстроген-замещающая терапия связана с некоторыми случаями рака груди и яичников, так как этот гормон стимулирует клеточную пролиферацию.
Образ жизни	Отсутствие физической нагрузки и плохое питание связаны с повышенным риском заболевания раком, хотя механизм неясен.

• **Протоонкогены** кодируют белки, функция которых в организме заключается в стимуляции роста и пролиферации клеток. В нормальных условиях эти гены экспрессируются только в быстро делящихся клетках, причем необходимо, чтобы белки (продукты этих генов) были активированы внешними сигналами стимуляции роста. Если мутации вызывают суперэкспрессию таких генов или повышенную активность соответствующих белковых продуктов, то может происходить неконтролируемая пролиферация. Мутантные версии протоонкогенов, которые увеличивают риск заболевания раком, называются просто **онкогенами**. Необходимо присутствие только одной копии, поскольку действия онкогенов доминантны.

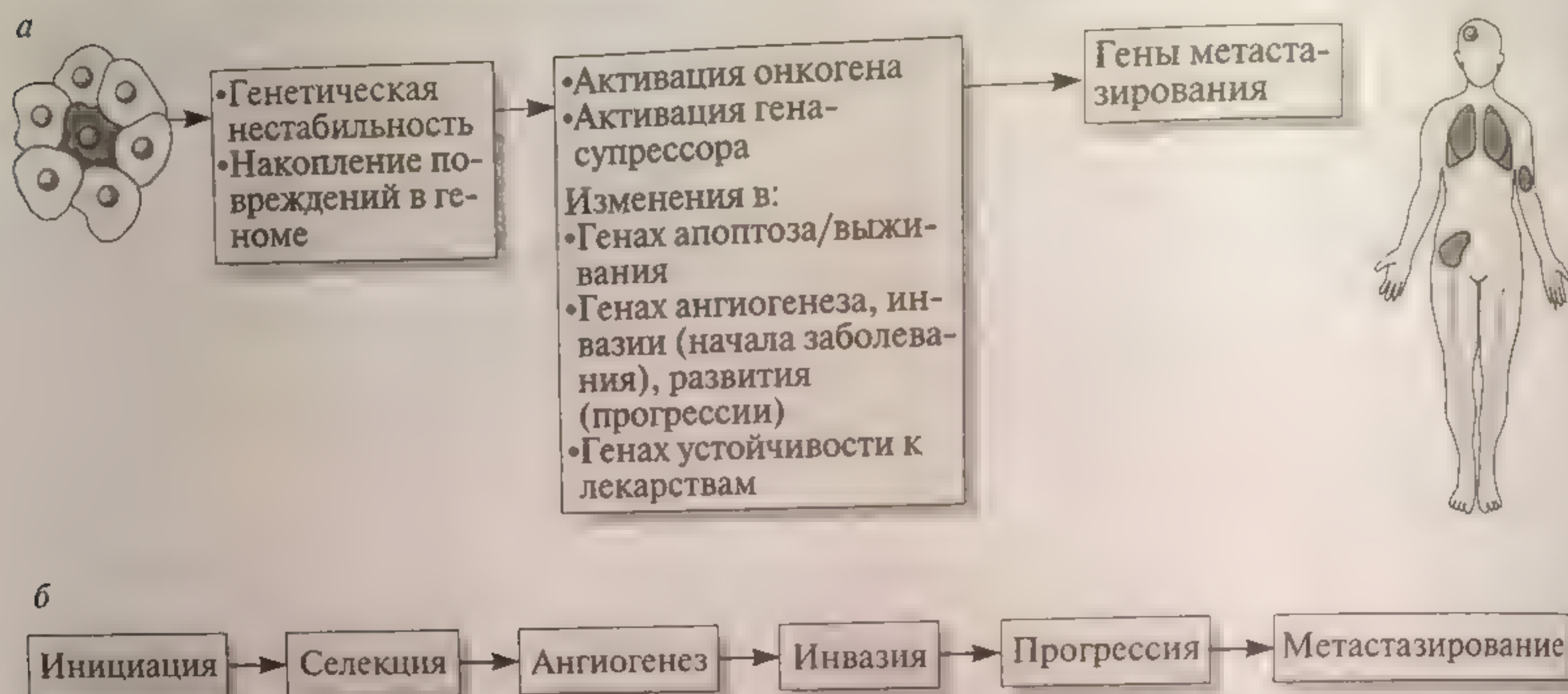


Рис. 5-1 Развитие рака, представленное в виде последовательности генетических процессов (а) и физических процессов (б).

• **Гены опухолевых супрессоров** кодируют белки, функция которых в организме — подавлять рост и пролиферацию клеток. Эти гены могут замедлять цикл деления клеток (в противоположность протоонкогенам, ускоряющим этот процесс) или они могут обладать другими функциями, такими как стимуляция клеточной дифференциации или программируемой смерти клеток. В случае нарушения одной из этих функций возникает избыток размножающихся клеток. Для возникновения большинства форм рака обе копии гена опухолевого супрессора должны быть инактивированы.

Продукты протоонкогенов в нормальной клетке выполняют целый ряд функций. Например, они могут быть факторами роста, рецепторами, компонентами внутриклеточных сигнальных путей, факторами транскрипции или регуляторными белками, которые способствуют протеканию процессов клеточного цикла. Превращение протоонкогена в онкоген, вызывающий развитие рака, может происходить четырьмя различными путями (несколько примеров приведено в табл. 5-3). Отметим, что все четыре механизма включают **приобретение функции**. В случае генов опухолевых супрессоров, которые способствуют предотвращению клеточной пролиферации, напротив, к раку ведет утрата функции. Это может быть вызвано делецией всего гена или точковой мутацией. Однако становится все более очевидным, что в случае многих форм рака гены опухолевых супрессоров выключаются **эпигенетически** в результате метилирования ДНК и перестройки структуры хроматина. Функции некоторых ключевых протоонкогенов и генов опухолевых супрессоров показаны в дополнении 5-2.

Другие классы генов оказывают не прямое действие на развитие рака. Основная категория — гены **предрасположенности к опухолевым**

Таблица 5-3 Примеры четырех механизмов превращения протоонкогенов в онкогены

Механизм	Ген (продукт)	Пример
Амплификация всего гена, приводящая к суперэкспрессии нормального белка	<i>ERBB2</i> (мембраносканирующий рецептор)	Рак груди
Точковая мутация вызывает повышенную активность или конститутивную активность белка	Семейство <i>RAS</i> (внутриклеточный сигнальный белок)	Многие формы рака
Хромосомная транслокация создает химерный ген. Слитый белок обладает повышенной активностью	<i>ABL</i> (внутриклеточный сигнальный белок)	Химерный ген <i>BCR-ABL</i> , хроническая миелоидная лейкемия
Хромосомная транслокация перемещает ген из неактивного хроматина в активный, что приводит к повышенной экспрессии нормального белка	<i>MYC</i> (фактор транскрипции)	Лимфома Беркитта

заболеваниям, функция которых — поддерживать стабильность генома. Эти гены часто вовлечены в репликацию и репарацию ДНК, и мутации в них делают геном более подверженным дальнейшим мутациям. Последние увеличивают вероятность повреждений в протоонкогенах и генах опухолевых супрессоров. Например, мутации в генах *MSH2* и

Дополнение 5-2 Молекулярный контроль клеточной пролиферации

Клеточная пролиферация тесно связана с контролем клеточного цикла, который представляет собой серию событий, происходящих между двумя последовательными делениями клеток (рис. Д5-2а). Наиболее важные события клеточного цикла — репликация ДНК (синтез, или **S-фаза**) и митоз (**M-фаза**) — разделены промежуточными фазами (**G1** и **G2**), во время которых клетка растет и накапливает макромолекулы. Прохождение через клеточный цикл контролируется семейством белков, названных **циклинами**, которые работают согласованно с циклин-зависимыми киназами (**CDK**). Комплексы циклин — CDK активируют ключевые белки, необходимые на каждой стадии клеточного цикла, путем фосфорилирования, т. е. активируют компоненты ДНК-полимеразы в начале S-фазы, способствуя началу репликации ДНК.

Комплексы циклин — CDK **активируются** внешними факторами роста через сигналь-

ные пути, и многие из компонентов этих путей являются **протоонкогенами**, так как их повышенная активность промотирует клеточное деление (рис. Д5-2б). Чтобы поддерживать стабильность генома, комплексы циклин — CDK должны также **ингибироваться** внутренними сигналами. Такие сигналы предотвращают начало митоза, если репликация еще не прошла полностью, и предотвращают начало репликации ДНК, если не завершилось клеточное деление. Важный компонент регуляторной системы — предотвращение клеточного деления, если в ДНК есть нерепарированное повреждение: клеточный цикл должен либо остановиться, пока не произойдет репарация, либо должен реализоваться процесс программируемой смерти клетки, называемый апоптозом, в случае, если репарация невозможна. **Гены опухолевых супрессоров** контролируют эти процессы, действуя в так называемых «сверочных точ-

ках», которые контролируют прогрессию клеточного цикла на определенных стадиях. В человеческих клетках наиболее важная свертная точка имеет место при **G1/S-переходе** (начало репликации ДНК). В этой точке действует несколько продуктов генов опухолевых супрессоров, включая **белок ретинобластомы pRB** и продукт гена

p53, который называется просто **p53**. По-видимому, утрата функции p53 — наиболее важное изменение в случае большинства форм рака, так как этот белок играет ключевую роль в остановке клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК и в индукции апоптоза. По этой причине p53 возвели в ранг «хранителя генома».

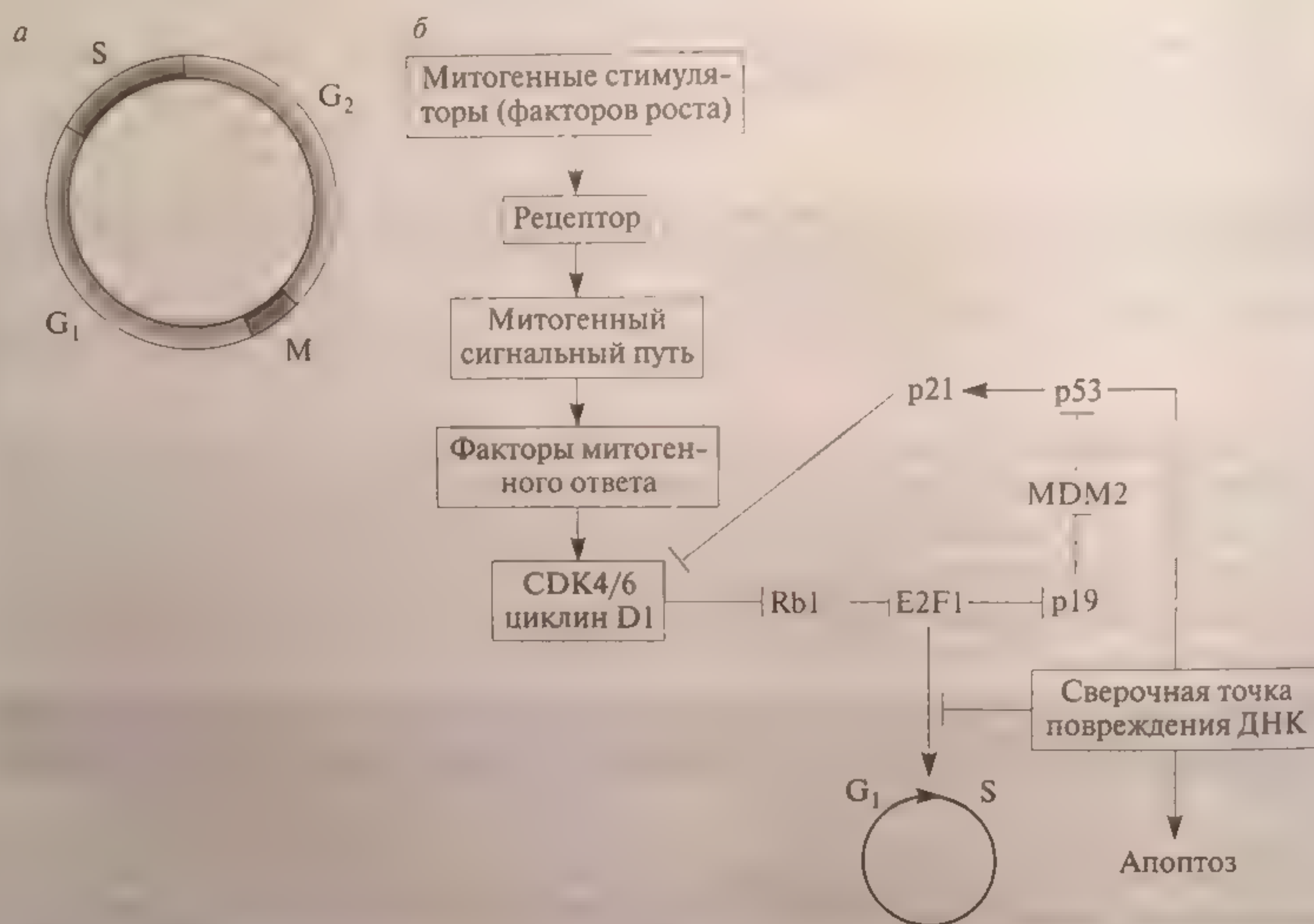


Рис. Д5-2 а — клеточный цикл; б — белки, участвующие в регуляции клеточного цикла.

MLH1, участвующих в репарации неспаренных оснований (коррекция неспаренных оснований после репликации ДНК), часто наблюдаются в случае наследственного неполипозного рака толстой кишки (HNPCC). Эти опухоли демонстрируют значительную **микросателлитную нестабильность** (тенденция к увеличению или уменьшению числа коротких tandemных повторов в процессе последовательных циклов репликации ДНК). Большинство других форм рака сопровождаются хромосомной нестабильностью, проявляющейся в ненормальных кариотипах с множественными хромосомными перестройками. Другие гены участвуют на более поздних стадиях рака. Такие гены могут, в частности, способствовать ангиогенезу (росту кровяных сосудов) или потере клеточной адгезии. В эту группу могут также входить гены устойчивости к лекарствам.

Роль геномики в изучении рака

Для идентификации генов, участвующих в развитии рака (в отличие от генов других человеческих болезней), существует несколько кратчайших путей. Например, доминантные онкогены можно идентифицировать **функциональным анализом** в клеточных линиях, которые уже утратили ряд ключевых факторов роста. Гены опухолевых супрессоров и гены предрасположенности к раку можно идентифицировать путем анализа **потери гетерозиготности** в опухолях индивидуумов, уже при рождении лишенных одной копии гена. В сущности, это метод диагностики, при котором используется гибридизация по Саузерну или, чаще всего, ПЦР-анализ (см. гл. 1) для выявления фрагментов ДНК, которые присутствуют в нормальных клетках, но отсутствуют в опухолевых клетках (рис. 5-2). Более современный метод **сравнительной геномной гибридизации** (CGH — *от англ. comparison genome hybridization*) может быть использован для выявления районов генома, которые содержат амплификации генов, вызывающие рак. Этот стандартный подход с использованием хромосомных пластинок в настоящее время вытесняется гораздо более удобными методами, основанными на применении геномных микрочипов.

Геномика предоставляет еще большие возможности для идентификации и функциональной характеристики генов, связанных с раком. Еще важнее то, что она также обеспечивает экспериментальными методами для установления функциональных связей между генами. Полная последовательность генома человека содержит список всех генов любого района хромосомы, что можно использовать для идентификации кандидатов

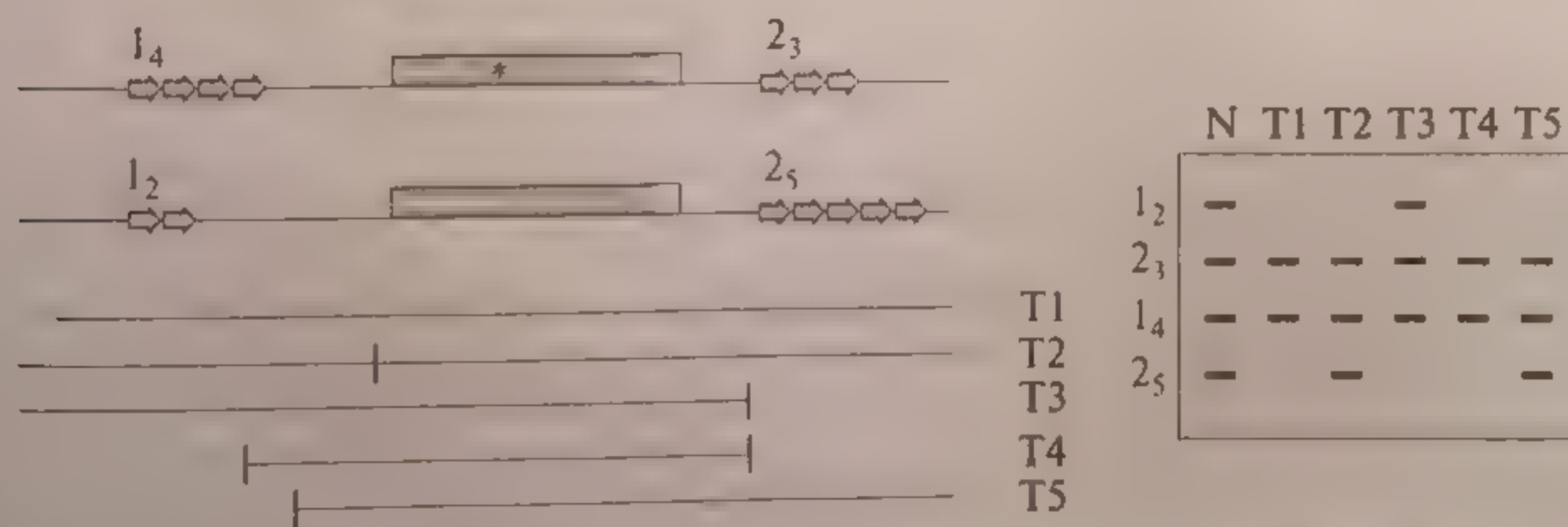


Рис. 5-2 Потеря гетерозиготности (ПГ) позволяет выявлять присутствие генов опухолевых супрессоров. В данном случае кандидат на роль гена опухолевого супрессора фланкирован двумя микросателлитными маркерами (1 и 2). Исследуемый индивидуум унаследовал один нефункциональный аллель (*) и один функциональный аллель гена опухолевого супрессора. Анализ опухолевой ткани показывает, что ассоциированные с мутантным аллелем микросателлитные маркеры сохранились, а ассоциированные с функциональным аллелем исчезли. Это позволяет предположить, что функциональный аллель был заменен в результате гомологичной рекомбинации или делетирован в составе более протяженного фрагмента, включающего также фланкирующие маркеры. Так как ПГ используется для картирования нескольких генов опухолевых супрессоров, должно быть охарактеризовано много образцов опухолей, чтобы установить, какие делеции являются причинными, а какие отражают случайную нестабильность генома.

в гены опухолевых супрессоров или онкогены, выявленных анализом потери гомозиготности или сравнительной гибридизацией. Поиск гомологий среди 150 (или около того) генов рака, которые уже были идентифицированы, также может оказаться полезным для выявления функциональных гомологов, хотя предварительный анализ с использованием этой стратегии пока не позволил обнаружить новых кандидатов. Противоположный подход предполагает использование сравнительной геномики для поиска генов, не являющихся кандидатами. Рак — это болезнь животных с относительно продолжительным временем жизни, и, следовательно, защитные механизмы, предотвращающие рак, являясь следствием эволюционной адаптации, возникли относительно недавно. Хотя геном дрожжей содержит значительное количество генов, контролирующих стабильность ДНК и клеточную пролиферацию, оказывается, что не существует ортологов для 30 (или около того) генов опухолевых супрессоров, которые были обнаружены у человека. В этой связи геном дрожжей можно было бы использовать для выявления в геноме человека тех генов, которые не являются генами-кандидатами опухолевых супрессоров.

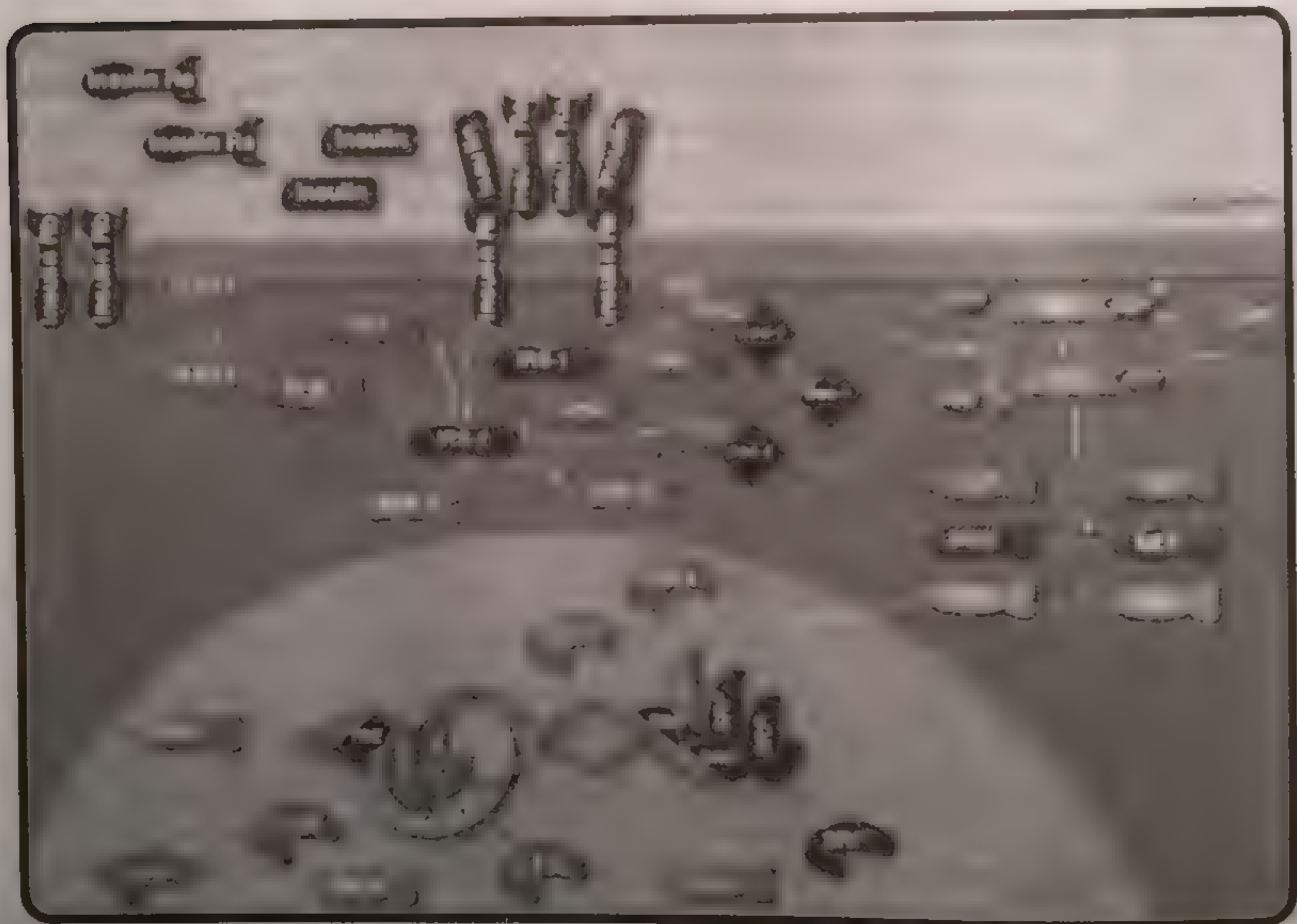


Рис. 5-3 Инсулиновый сигнальный путь, представленный на Интернет-сайте CGAP. Это один из многих представленных на сайте путей, имеющих отношение к раку, где указаны гены, информация о хромосомах и тканях, а также данные по экспрессии (<http://cgap.nci.nih.gov/BioCarta/insulinPathway/>).

ров, что дало бы возможность ученым сконцентрироваться в своих исследованиях на остальных генах.

Для идентификации генов рака все большее применение находят методы функциональной геномики (см. гл. 2). Например, сиквенсный сэмплинг, микрочипы, анализ протеомов использовались для идентификации генов и белков, экспрессия которых понижена или повышена в случае заболевания раком. Эти данные собирают в рамках проекта Cancer Genome Anatomy Project («Генетическая анатомия рака»), цель которого воссоздать полную молекулярную картину для каждой формы рака (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CGAP/>) (рис. 5-3). Другой подход функциональной геномики, играющий важную роль в исследованиях рака, включает методы картирования межбелковых взаимодействий, в частности, на основе дрожжевой двугибридной системы. Например, один из самых ранних крупномасштабных экспериментов по двугибридному скринингу был основан на использовании циклин-зависимых киназ дрозофилы в качестве бейт-белка, чтобы выявить новые регуляторы клеточного цикла. И масс-спектрометрия была использована для идентификации новых компонентов сигнального пути эпидермального фактора роста, избыточная активность которых часто приводит к раку груди. Анализ белковых взаимодействий особенно важен для разработки противораковых препаратов, которые блокируют клеточную пролиферацию в результате конкуренции за связывание с поверхностными белками.

Новые методы диагностики рака

Диагностика рака обычно осуществляется после физического исследования, за которым, как правило, следует анализ образцов (кровь, моча) или тканевых биопсий с целью получения доказательств существования неопластических клеток или их продуктов. Для подтверждения наличия глубоких опухолей используются более сложные методы, например ультразвук, бариевая радиография или аксиальная компьютерная томография (АКТ). Вклад биотехнологии и геномики в диагностику рака выражается в разработке новых иммунологических методов детекции специфических опухолей и в использовании анализа транскриптов и протеомов для классификации болезни и установления ее стадии.

Разработка антител в качестве терапевтических агентов обсуждается в гл. 6, поэтому здесь мы не будем об этом говорить подробно. Достаточно сказать, что антитела способны связываться с целевыми антигенами с большой специфичностью. Поэтому антитела, узнающие опухолеспецифичные антигены, могут быть полезны для позитивной идентификации опухолевых клеток в различных образцах, включая образцы биопсии. Кроме того, антитела узнают раковые клетки *in vivo* и поэтому накапливаются в районе опухоли после введения в кровь больного раком. Использование антител с присоединенной радиоактивной меткой обсуждается далее при рассмотрении радиотерапии, но этот подход

может также быть полезен для локализации опухолей радиографией. В качестве примеров разрабатываемых диагностических антител следует упомянуть антитела, узнающие карциноэмбриональный антиген (такой антиген экспрессируется на поверхности многих карцином) и человеческий хорионный гонадотропин, который тоже синтезируется в некоторых опухолях.

Иногда невозможно использовать антитела для идентификации раковых опухолей по экспрессирующимся в них маркерным белкам. Действительно, нередко бывает трудно различить некоторые формы рака с использованием традиционных цитологических, цитогенетических и биохимических тестов. Это касается **острой миелоидной лейкемии (ОМЛ)** и **острой лимфобластной лейкемии (ОЛЛ)**, диагностика которых базируется на проведении многих различных тестов, причем ни один из тестов не обеспечивает 100% надежности. Важно то, что болезни по-разному реагируют на лекарственную терапию: даунорубин и цитарабин более эффективны в случае ОМЛ, а пациенты с ОЛЛ лучше реагируют на винкристин и метотрексат. Следовательно, для благоприятного клинического результата очень важен правильный диагноз.

Недавно было показано, что точный диагноз можно устанавливать с помощью ДНК-микрочипов, позволяющих увидеть полные профили экспрессии генов (рис. 5.4). В то время как традиционные тесты ищут оди-

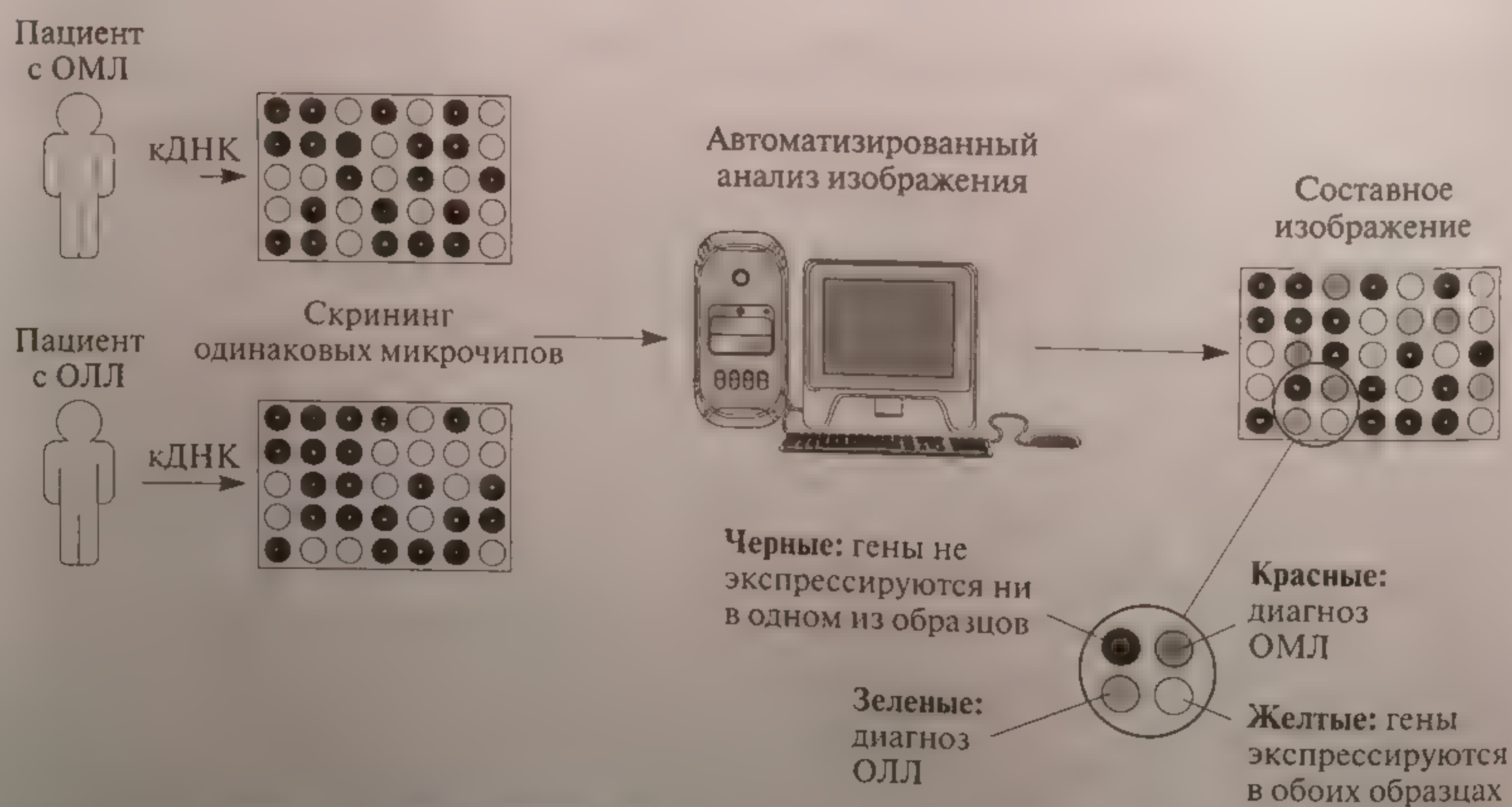


Рис. 5-4 Глобальные профили экспрессии для диагностики рака. Сравнительный анализ образцов от пациентов с острой миелоидной лейкемией (ОМЛ) и острой лимфобластной лейкемией (ОЛЛ) выявляет гены, активность которых характерна для той или другой болезни. В то время как исследование отдельных генов не дает возможности провести разграничение, профили генной экспрессии, включающие 50–100 генов, позволяют с большой степенью достоверности диагностировать заболевание.

ночные маркеры, метод микрочипов включает анализ приблизительно 50 профилей генной экспрессии, что обеспечивает гораздо большую степень установления различий. Алгоритмы кластеризации данных используются для анализа профилей и отнесения образцов к нужной категории, этот процесс известен как **предсказание класса**. В одном исследовании 36 из 38 пациентов были правильно разделены на группы ОМЛ или ООЛ на основании единственного теста. Аналогичные тесты в настоящее время разрабатываются для ряда плотных опухолей.

Тот же метод может быть использован не только для классификации уже известных подтипов болезни, но и для идентификации новых. Например, только 40% пациентов с неходжкинской лимфомой отвечают на современную терапию. До недавнего времени невозможно было сказать, какие пациенты ответят на лечение до его начала. Однако с помощью ДНК-микрочипов было обнаружено два ранее нераспознаваемых подтипа болезни, которые соответствовали различным клиническим исходам и ответам на лекарственную терапию. В этом случае алгоритмы кластеризации данных не содержали заранее заданных категорий болезни, и метод анализа, известный как **обнаружение класса**, позволил отнести новую болезнь к разряду ранее **неустановленных**.

В то время как некоторые виды рака можно диагностировать по изменению уровня мРНК, часто более информативным оказывается определение уровня белков, поскольку именно они (белки) являются истинными функциональными молекулами клетки. Если изменения, связанные с болезнью, происходят посттранскрипционно, то уровень белка может меняться, в то время как количество соответствующего транскрипта будет оставаться тем же. Двумерный электрофорез с последующей масс-спектрометрией, являющийся главной технологической основой протеомики, может быть использован для сравнения образцов, взятых у здоровых и больных людей, и идентификации белков, пригодных в качестве маркеров болезни (рис. 5-5). Например, были идентифицированы белки, которые можно использовать для диагностики рака груди, рака толстой кишки и рака мочевого пузыря, причем в последнем случае были найдены различные белки, характерные для различных стадий заболевания. Это позволяет точно устанавливать стадию и назначать соответствующее лечение по мере прогрессирования заболевания от начального переходного эпителия до более агрессивной чешуйчато-клеточной карциномы. Ниже обсуждаются два примера, демонстрирующих преимущества протеомного анализа в качестве метода диагностики в тех ситуациях, когда анализ транскриптов непригоден.

- Был идентифицирован белок, называемый **статмином**, уровень которого необычно высок в случае детской лейкемии. Однако только **фосфорилированная** форма статмина указывает на наличие болезни. Нефосфорилированная форма обнаруживается в одном и том же количестве как у здоровых, так и у больных детей. Регуляторные механизмы предполагают фосфорилирование многих белков, и в случае статмина (внутриклеточного сигнального белка, который участвует в передаче сигналов роста)

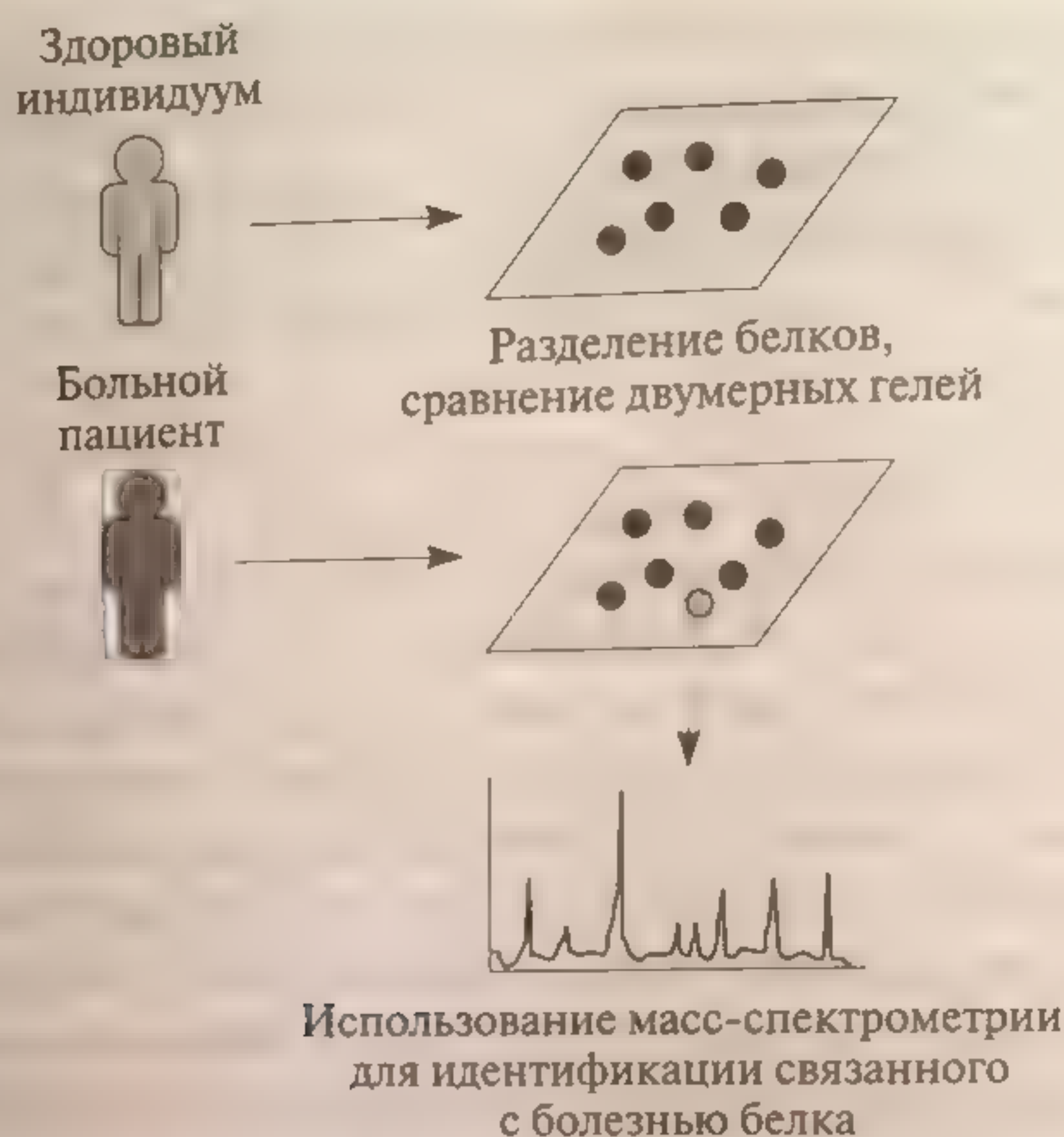


Рис. 5-5 Профилирование болезней протеомными методами. Сравнение профилей экспрессии белков, выделенных из здоровых и больных организмов, двумерным электрофорезом (как показано здесь) или методом комбинации жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии позволило выделить и охарактеризовать белки, которые присутствуют или отсутствуют в состоянии болезни. Такие белки представляют собой потенциальные маркеры болезни или терапевтические мишени.

фосфорилирование необходимо для трансдукции сигнала роста. Соотношение фосфорилированного и нефосфорилированного статмина может быть определено методами протеомики, обе формы белка кодируются одной и той же мРНК, так что анализ транскриптов оказывается неинформативным.

- Белок, называемый псориазин, был идентифицирован как ранний маркер рака мочевого пузыря. Псориазин можно определять в моче, которая, как и большинство жидкостей в организме, не содержит мРНК. В этом случае протеомика — наилучший метод анализа не потому, что уровень мРНК неинформативен, а потому, что нечего определять (отсутствует мРНК).

Новые подходы к лечению рака

Существует четыре основных подхода лечения рака: хирургия, радиотерапия, химиотерапия и биотерапия. Хирургия по-прежнему является ведущим методом лечения в 30% случаев рака, особенно для опухолей, обнаруженных на ранней стадии. Хирургия может использоваться для лечения рака, для диагностирования стадии (тканевая биопсия), а также для наблюдения (так называемые повторные операции для про-

верки успешности первого хирургического вмешательства или для выбора альтернативного лечения). В случае слишком далеко зашедшего рака хирургия используется как паллиативный метод лечения (т. е. уменьшение опухолевой массы, чтобы убрать симптомы). Три другие метода лечения так или иначе связаны с технологией рекомбинантных ДНК и геномикой.

Радиотерапия

Радиотерапия — это способ лечения рака рентгеновскими лучами или другими формами радиации, которые воздействуют на организм либо снаружи (телетерапия), либо изнутри в результате введения в организм изотопов (брахитерапия). Радиация, по-видимому, повреждает ДНК опухолевых клеток. Применимость радиотерапии зависит от разницы в чувствительности к радиации со стороны опухоли и окружающих тканей. Чувствительность отчасти обусловлена содержанием кислорода в ткани, так как под действием радиации возникают свободные радикалы, вызывающие вторичные повреждения ДНК. Чрезвычайно чувствительные к радиации опухоли легко разрушаются очень низкими дозами, а те, что обладают низкой чувствительностью, нуждаются в более высоких дозах. Тогда следует правильно оценивать влияние радиации на окружающие ткани, особенно если опухоль находится в чувствительном органе. Радиотерапию можно использовать для лечения многих локализованных опухолей, включая операбельные (такие как опухоли груди) и неоперабельные (такие как опухоли нервной системы). Кроме того, радиотерапия применяется после хирургической операции для уничтожения остаточных раковых клеток. Метод обладает рядом выраженных побочных эффектов (например, выпадение волос, поражение костного мозга), что отражает влияние радиации на клетки тела, которые в норме быстро делятся. Более долгосрочные побочные эффекты также наблюдаются, когда радиация убивает ткани, возобновляющиеся медленнее.

Как упоминалось выше, антитела можно использовать для доставки радиоизотопов к опухолям для диагностической визуализации. Однако если использовать более мощные изотопы, такие как иттрий-90 (^{90}Y) и иод-131 (^{131}I), то можно очень эффективно уничтожать опухолевые клетки. Антитела, узнающие опухолеспецифические антигены, помогают концентрировать изотоп в месте локализации опухоли, максимально увеличивая смертоносный эффект для опухолевых клеток и минимизируя влияние на окружающие ткани. Этот подход известен как **радиоиммунотерапия (РИТ)**; он оказался очень успешным при лечении гематологических раков и, в меньшей степени, для лечения некоторых опухолей.

Недостаток обычной РИТ состоит в том, что влияние циркулирующих радиоактивных антител часто приводит к повреждению костного мозга и стволовых клеток. Для преодоления этой проблемы было разработано несколько новых подходов, включающих **предварительный выбор мишени**. Например, для лечения рака яичников был использован трехступенчатый



Рис. 5-6 Трехступенчатая процедура радиоиммунотерапии, использованная для лечения пациента, страдающего раком яичников. Опухоль была обозначена в качестве мишени биотинилированным моноклональным антителом, и после удаления из организма не-связавшихся конъюгатов был инъецирован комплекс стрептавидин-радиоизотоп.

подход (рис. 5-6). На первой стадии в организм вводится антитело с присоединенным остатком биотина, узнающее опухолевый антиген. Затем вводится второй компонент, который выводит из системы кровообращения циркулирующие антитела. Наконец, вводится содержащий радиоизотоп стрептавидин, который доставляет высокую дозу радиоактивности непосредственно к раковой опухоли с минимальным уровнем вреда для других тканей. Этот подход основан на высоком сродстве биотина и стрептавидина, что позволяет целенаправленно и эффективно воздействовать на опухоль.

Химиотерапия

Химиотерапия — это способ лечения рака с использованием лекарств, а именно «малых молекул», если сравнивать с белками и нуклеиновыми кислотами. Идеальное лекарство против рака должно селективно убивать раковые клетки, оставляя нормальные клетки невредимыми. Большинство современных противораковых препаратов

очень далеки от такого идеала, поскольку влияют на все пролиферирующие клетки, вызывая тяжелые побочные эффекты. Эти химиотерапевтические агенты — либо вещества, повреждающие ДНК (например, алкилирующие агенты типа хлорамбуцила), антиметаболиты (такие как метотрексат, который препятствует синтезу ДНК) или химические вещества, препятствующие клеточному циклу (например, паклитаксель, винкристин).

Молекулярная биология и геномика могут предложить многое в области разработки противораковых препаратов, так как они создают основу для более целенаправленной терапии. Клонирование и характеристика онкогенов и генов опухолевых супрессоров создают новые мишени для разработки лекарств, и селективность лекарств может быть повышена в результате исследования структуры и взаимодействия соответствующих белков. Отметим, что специфичные для опухолей маркеры, идентифицируемые с помощью транскрипционных профилей, гибридизация на микрочипах и протеомика (например, статмин, см. выше) позволяют выявлять возможные мишени. Статус мишеней может быть подтвержден путем сбора информации об их экспрессии и биохимической функции, а также путем определения частоты, с которой происходит нарушение их регуляции при различных формах рака. Если такие мишени оказываются не совсем пригодными (например, если ген проявляет обширный полиморфизм), то белки, взаимодействующие с ними в составе комплексов или на путях метаболизма, могут стать подходящей альтернативой. Такие белки можно идентифицировать с помощью двугибридной системы и аналогичных подходов.

Затем могут быть осуществлены программы поиска (скрининга) лидирующих соединений, терапевтическая активность которых может быть оптимизирована. Для выявления наиболее подходящих лекарственных кандидатов можно использовать комбинацию двух подходов: широко-масштабный скрининг химических библиотек и рациональный дизайн лекарств; некоторые примеры разрабатываемых или недавно утвержденных специфичных к мишени соединений перечислены в табл. 5-4. Первым специфичным к мишени низкомолекулярным лекарством, получившим подтверждение о своей регуляторной функции, стал гливек, который связывается с продуктом химерного гена ABL-BCR, характерного для хронической миелоидной лейкемии. В этих программах скрининга перечислены такие модельные организмы, как *Drosophila* и *Caenorhabditis*, поскольку сигнальные пути факторов роста чрезвычайно консервативны у человека и этих более простых животных. Даже дрожжевые клетки могут быть пригодны для тестирования некоторых лекарств, поскольку многие компоненты регуляторной системы клеточного цикла и основного контроля генной экспрессии консервативны у человека и дрожжей.

Технология рекомбинантных ДНК и методы геномики также полезны для рационализации синтеза противораковых препаратов. Например, некоторые современные противораковые препараты получены из растений

Таблица 5-4 Некоторые разрабатываемые «низкомолекулярные» химиотерапевтические агенты, предназначенные для воздействия на специфические белки, регуляция которых нарушена в случае рака

Лекарство	Мишень	Функция
Иресса (ZD1839)	EGF рецептор	Рецептор фактора роста, суперактивность наблюдается при нескольких формах рака
Ингибиторы фарнезил-трансферазы (ингибирует мембранную локализацию)	Семейство Ras	Участие в сигнальном пути фактора роста, суперактивность — индикатор многих раковых заболеваний
Вортманин	PI3-киназа	Регулятор вторичных мессенджеров, необходимых для пролиферации выживания и ангиогенеза
Флавопиридол, индирубин	Циклин-зависимая киназа	Контроль клеточного цикла
Пититрин-α (активирует p53-зависимые гены)	p53	Главный опухолевый супрессор, известный как «хранитель клеточного цикла»
PS-341	26S протеосома	Деградация белков, уничтожает белки опухолевых супрессоров
17AAG	Hsp90	Молекулярный шаперон, необходимый для фолдинга и стабильности многих онкобелков
Гливек (ST-1571)	BCR-ABL	Опухолеспецифический химерный белок, внутриклеточная протеин-киназа

(сюда входят митотические ингибиторы паклитаксель, винбластин и винкристин). К сожалению, эти молекулы продуцируются в малых количествах, что делает их экстракцию чрезвычайно дорогостоящей и ограничивает применение. Паклитаксель сейчас гораздо более доступен, поскольку производится в суспензионных культурах растительных клеток. Однако из-за сложности метаболических путей, приводящих к синтезу винбластина и винкристина, аналогичная система производства этих лекарств пока еще только разрабатывается.

Генная инженерия растений предполагает проведение генетической модификации с целью изменения направления реакций, включенных в метаболические пути (**метаболическая инженерия**). Винбластин и винкристин продуцируются в растении мадагаскарский барвинок (*Catharanthus roseus*). Оба лекарства — терпеновые индольные алкалоиды, конечные продукты длинного и сложного метаболического пути, включающего по крайней мере 20 ферментативных стадий, протекающих в нескольких различных клеточных компартментах. С помощью метаболической

Рис. 5-7 Уп
образова
стие множе
стадиях пр
также слож
усложняю
TDC (три
«узкого м
попросту
Единстве
экспресс
ших в ме

инжен
метабо
или к
Напр
скор
этом
выш
Хот
фер
не
ме

ля
н
н
т

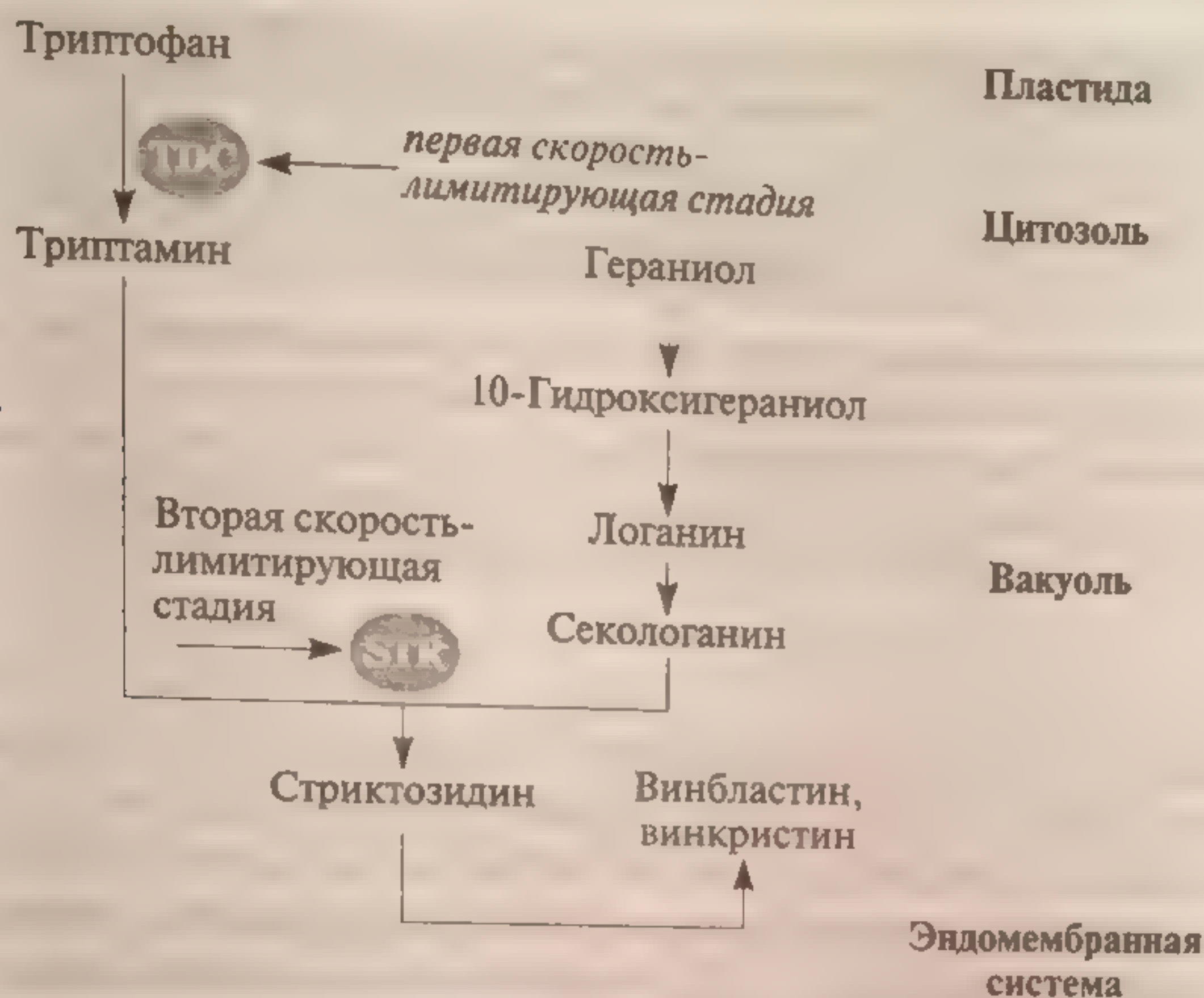


Рис. 5-7 Упрощенная схема метаболического пути у *Catharanthus roseus*, приводящего к образованию противораковых препаратов винбластина и винкристина. Отметим участие множества клеточных компартментов и пересечение двух независимых путей на стадиях превращения триптамина и секологанина в стриктозидин. Эти особенности, а также сложная регуляция на уровнях генной экспрессии и белковой активности сильно усложняют воспроизведение пути в системах клеточных культур. Показаны ферменты TDC (триптофан-декарбоксилаза) и STR (стриктозидин-синтаза). Устранение первого «узкого места» (скорость-лимитирующей стадии) путем увеличения количества TDC попросту позволило выявить на пути следующее узкое место — стадию получения STR. Единственно возможный ключ к решению этой проблемы — идентификация и суперэкспрессия факторов транскрипции, которые регулируют множество генов, участвующих в метаболическом пути.

инженерии можно осуществить модификацию определенных этапов метаболического пути, например удалить скорость-лимитирующие стадии или ингибиторы и, таким образом, повысить выход желаемых молекул. Например, ключевая ранняя стадия метаболического пути катализируется скоростью-лимитирующим ферментом триптофан-декарбоксилазой, поэтому для увеличения количества этого фермента и, соответственно, повышения выхода алкалоидов была осуществлена суперэкспрессия гена *tdc*. Хотя этот подход и привел к накоплению непосредственного продукта ферментативной реакции триптамина, увеличения продукции алкалоида не наблюдалось, поскольку лимитирующей стала следующая стадия метаболического пути (рис. 5-7).

Геномные исследования позволяют решать эти проблемы, предоставляя более подробную информацию о метаболических путях и регуляторных системах. Кроме того, метод высокопроизводительного функционального анализа дает возможность идентифицировать основные регуляторные гены. Например, использование конструкции «активационных

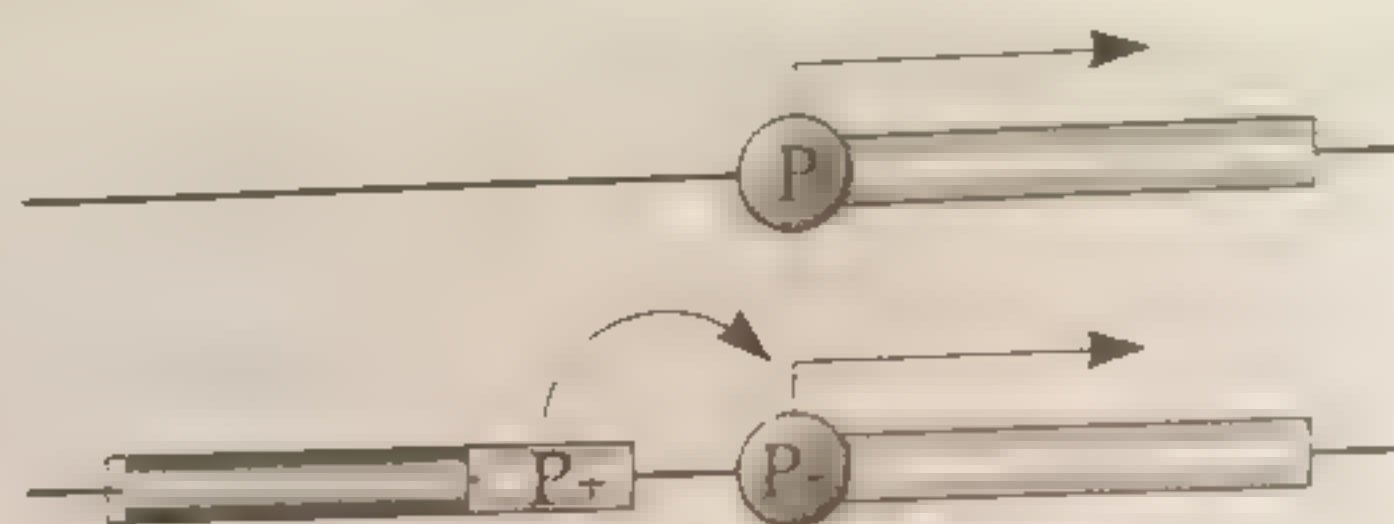


Рис. 5-8 Активационные ловушки для идентификации фенотипов, связанных с приобретением функций, таких как увеличение продукции алкалоидов в растениях. Вверху — эндогенный растительный ген под контролем слабого или ограниченно работающего промотора. Интеграция конструкции с активационной ловушкой, которая содержит сильный направленный в ту же сторону промотор, повышает активность прилегающего гена.

ловушек», которые встраиваются случайным образом в геном и активируют прилегающие к ним гены (рис. 5-8), позволило идентифицировать ключевой транскрипционный фактор, который координирует несколько стадий пути биосинтеза алкалоидов. Другой фактор транскрипции с аналогичными свойствами был найден с помощью одного из вариантов дрожжевой двугибридной системы (с. 78), предназначенной для идентификации белков, связывающихся со специфическими последовательностями ДНК. Альтернативный подход — перенос полных метаболических путей в новые хозяйские организмы. Например, недавно было показано, что витамин А может быть синтезирован в зернах риса путем введения всех компонентов метаболического пути из других источников. Возможно, в будущем такие лекарства, как винбластин и винкристин, будут получать таким путем.

Биотерапия

Биотерапия — новейшее направление в раковой терапии, использующее биологические агенты, такие как белки (включая антитела), пептиды, нуклеиновые кислоты, вирусы и целые клетки. Хотя границы между разными методами биотерапии размыты, мы сконцентрируем наше внимание на использовании белков в качестве терапевтических агентов и отложим рассмотрение терапии с помощью нуклеиновых кислот (включая генную терапию для лечения рака) до гл. 8. В настоящее время существует лишь несколько разрешенных к использованию биотерапевтических агентов, однако в научной литературе описано множество новых подходов и некоторые из них проходят клинические испытания. Обычное биотерапевтическое лечение включает использование интерферонов и интерлейкинов для стимуляции иммунной системы. Например, белок альфа-интерферон используется при амбулаторном лечении; он увеличивает антигенность опухоли путем повышения активности генов главного комплекса гистосовместимости и повышения активности цитотоксических Т-лимфоцитов. Напротив, интерлейкин 2 (IL-2) применяется для лечения в стационаре. Его основная антиопухолевая активность заключается в стимуляции выработки

лимфокин-активированных клеток-киллеров, которые проникают в опухоли и освобождают токсины, убивающие раковые клетки. С другой стороны, IL-2 можно использовать для стимуляции активности взятых у пациента и культивированных Т-лимфоцитов, которые затем снова вводятся в организм. Эта стратегия называется **адоптивной биотерапией**.

Около 20% разрабатываемых в настоящее время фармацевтических препаратов — это антитела и их производные; многие из них предполагается использовать для лечения рака. Моноклональные антитела, которые узнают опухолевые антигены, запускают каскад комплемента и другие цитотоксические эффекторные механизмы, помогая тем самым разрушать раковые клетки и удалять их из организма. Однако в некоторых случаях существует доказательство того, что антитела действуют не только путем уничтожения опухолевых клеток, но и путем регуляции их роста. Например, антиидиотипические антитела, которые узнают рецепторы на поверхности злокачественных В-лимфоцитов, обладают прямым антипролиферативным эффектом, который может быть использован для лечения В-клеточной лимфомы. Герцептин был одним из первых терапевтических моноклональных антител, одобренным в качестве регулятора. Он узнает рецептор тирозинкиназы ErbB2, которая суперэкспрессируется в случае некоторых форм рака груди. Это антитело, по-видимому, действует путем увеличения скорости, с которой рецептор поглощается клеткой и деградирует; такой метод в комбинации с химиотерапией демонстрирует обнадеживающие результаты при лечении метастатического рака груди.

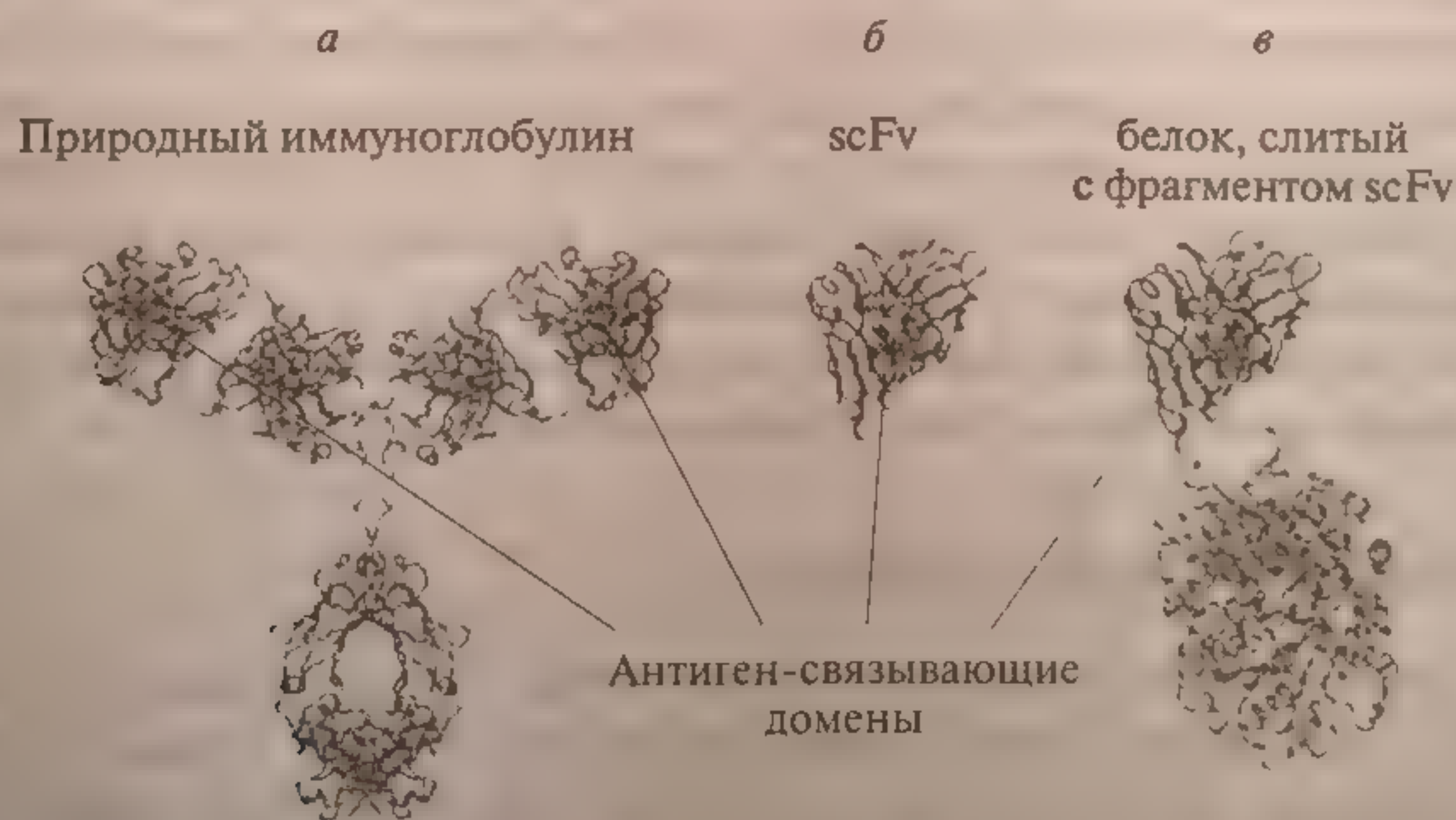


Рис. 5-9 Производные антител, используемые для лечения рака. *а* — структура природного иммуноглобулина с переменными областями (антиген-связывающие домены); *б* — одноцепочечный фрагмент Fv, который включает в себя переменные домены легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, соединенные с помощью подвижного полипептидного спейсера. Иммунные рекомбинантные белки, такие как иммунотоксины и иммуноцитоксины, получают путем экспрессии фрагментов scFv в составе слитых белков; *в* — структура слитого белка scFv-интерлейкин 2. Другие иммунопрепараты получают путем конъюгирования антибиотиков и других малых молекул с фрагментами scFv или полноразмерными антителами.

Более сложные производные антител включают **иммунотоксины**, у которых к антителу присоединен мощный токсин (например, рицин), и **иммунные препараты**, у которых к антителу присоединена малая молекула, например антибиотик (рис. 5-9). Клинические испытания обоих типов препаратов продемонстрировали успех в лечении различных форм рака. Например, соединенное с рицином антитело анти-CD25 было опробовано на пациентах с устойчивыми к химиотерапии формами лейкемии и лимфомы. Еще один подход — экспрессия антитела, слитого с РНазой, хотя это еще должно пройти клинические испытания. Иммунотоксины, судя по всему, работают лучше в случае гематологических раков, чем в случае плотных опухолей, в которых клетки жестко соединены между собой и мешают проникновению лекарства. Иммуноконъюгат, называемый BR96-DOX, содержит антибиотик доксорубин и проходит I и II фазы клинических испытаний для лечения рака груди.

Недавно разработанный **иммуноцитокин** представляет собой рекомбинантное антитело, экспрессирующееся в виде белка, слитого с цитокином, таким как IL-2. Преимущество этого подхода в том, что цитокин, который сохраняет свою независимую активность, концентрируется в районе опухоли. Доклинические исследования на мышинной модели нейробластомы показали, что IL-2, входящий в состав химерного белка, активирует достаточное количество иммунных клеток, чтобы устранить установившиеся метастазы. Последняя категория иммуноконъюгатов, которые могут выступать в качестве противораковых агентов — **абзимы** — антитела, соединенные с ферментами. Использование таких молекул предполагается в случае «**антитело-направленный фермент/пролекарственной терапии**» (ADEPT, терапия «направляемый антителом фермент/пролекарство»), при которой абзим превращает циркулирующее пролекарство (неактивное, нетоксичное) в токсичное противоопухолевое лекарство. Например, антитела, специфичные к карциноэмбриональному антигену и конъюгированные с β -глюкуронидазой, были использованы в доклинических исследованиях для превращения неактивного пролекарства глюкуронилдоксорубин в доксорубин в районе опухоли.

Новые терапевтические мишени

При изучении молекулярных путей, приводящих к возникновению рака, случайно были обнаружены некоторые новые и неожиданные участники этого процесса, которые представляют собой новые мишени для разработки лекарств. Например, **теломераза** — фермент, ответственный за добавление к концам хромосом защитных структур, называемых **теломерами**. Теломераза присутствует в клетках зародыша, но ее активность падает в большинстве наших клеток, так что хромосомы укорачиваются примерно на 100 п. н. за каждый раунд репликации. Культивируемые первичные клетки также не имеют теломеразы и после многих раундов деления достигают точки **старения**, когда перестают делиться, чтобы сохранить целостность хромосомы. Фибро-

бласты, не содержащие p53 и белка ретинобластомы, продолжают делиться и после точки старения вплоть до кризиса, когда большинство клеток умирает. Однако небольшое число клеток выживает, становясь иммортализованными. Обычно в этих клетках вновь появляется теломеразная активность. Точно так же теломераза активна *in vivo* в большинстве опухолей.

Другая новая группа мишеней — ферменты, которые контролируют метилирование ДНК и структуру хроматина. Эпигенетические модификации наблюдаются для многих видов рака, и список генов, выключенных таким путем, растет. К числу этих генов относятся не только гены опухолевых супрессоров, но также те, которые участвуют в апоптозе, репарации ДНК, метаболизме потенциальных канцерогенов и метастазировании. Лекарства, селективно препятствующие метилированию ДНК (например, 5-азацитидин) или ацетилированию/деацетилированию гистонов (например, фенилбутират) также проходят клинические испытания.

Наконец, ангиогенез (развитие новых сосудов в опухолевой ткани) — ключевой процесс прогрессии опухоли. Как только опухоли достигают до определенного размера, для поддержания своего роста они должны обзавестись независимой системой кровоснабжения. HIF-1 α (индуцируемый гипоксией фактор) — ключевая мишень на этом пути, поскольку он индуцируется в условиях низкого содержания кислорода и активирует 40 или более генов, необходимых для роста и развития кровеносных сосудов. Следовательно, для ограничения опухолевого роста можно использовать подходы, включающие ингибирование HIF-1 α и некоторых активирующих его ген элементов, расположенных в области, предшествующей началу гена (*upstream*) (включая PI3K, см. табл. 5-4). Антигены, имеющиеся на поверхности развивающихся кровеносных сосудов, могут также служить подходящими мишенями для иммунотерапии, так как этот подход не требует проникновения в опухоль. Были созданы антитела против ряда сосудистых мишеней, включая сосудистый эндотелиальный фактор роста, ангиогенин и эндоглин. Высокопроизводительный экспрессионный анализ и протеомика также играют важную роль, поскольку они помогают идентифицировать мишени, экспрессирующиеся в опухолевой сосудистой сети, но не нормальных кровеносных сосудах.

Дополнительная литература

POGM: В гл. 6 описаны некоторые стратегии клонирования, используемые для идентификации протоонкогенов и их онкогенных аналогов, вызывающих рак.

POGA: В гл. 7 обсуждается сравнительная геномика и консервативность генов и метаболических путей у различных организмов. В гл. 9 более детально описывается использование анализа транскриптов и методов протеомики для исследования рака, а в гл. 12 обсуждается скрининг взаимодействий.

Ниже приведены 12 великолепных обзоров, посвященных разработке низкомолекулярных противораковых препаратов.

Два статьи о применении геномики в исследовании и лечении рака:

Boyer TG, Chen P-L, Lee W-H (2001) Genome mining for human cancer genes: wherefore art thou? *Trends in Molecular Medicine* 7, 187–189.

Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E *et al.* (2001) Cancer and genomics. *Nature* 409, 850–852.

Обзоры по использованию методов транскриптомики и протеомики для обнаружения маркеров болезни и диагностики рака:

Celis JE, Kruhoffer M, Gromova I *et al.* (2000) Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Lett* 480, 2–16.

Lakhani SR, Ashworth A (2001) Microarray and histopathological analysis of tumors: the future and the past? *Nature Rev Cancer* 1, 151–157.

Всестороннее обсуждение применения рекомбинантных антител в диагностике и терапии рака:

Funaro A, Horenstein AL, Santoro P *et al.* (2000) Monoclonal antibodies and therapy of human cancers. *Biotechnol Adv* 18, 385–401.

Обзоры, касающиеся разработки противораковых препаратов, с основным упором на роль геномики в создании новых лекарств:

Garrett MD, Workman P (1999) Discovering novel chemotherapeutic drugs for the third millennium. *Eur J Cancer* 35, 2010–2030.

Gibbs JB (2000) Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science* 287, 1969–1973.

Workman P (2001) Changing times: developing cancer drugs in genomeland. *Curr Opin Invest Drugs* 2, 1128–1135.

Обзоры, в которых рассматриваются молекулярные основы возникновения рака:

Hahn WC, Weinberg RA (2002) Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Rev Cancer* 2, 331–340.

Hanahan D, Weinberg R (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev Genet* 3, 415–428.

Обзор по генной терапии, который связан с тематикой гл. 8:

Various authors (2002) A Trends guide to cancer therapeutics. *Trends Mol Med* 8 (4 Suppl).

Крупномасштабное производство биофармацевтических препаратов

Краткий обзор

Существует четыре типа биофармацевтических препаратов: нуклеиновые кислоты, белки, вирусы и клетки (табл. 6-1). За исключением некоторых нуклеиновых кислот, которые синтезируются химически, все биофармацевтические препараты производят крупномасштабным культивированием микробных или животных клеток (табл. 6-2). Крупномасштабное культивирование микроорганизмов осуществляется в ферментерах (реакторах с перемешиванием). Животные клетки гораздо более хрупкие, чем микробные клетки, и не могут выдерживать сдвиговых напряжений, генерируемых обычным ферментером. Некоторые из них не способны также расти в суспензионных культурах, что приводит к необходимости использования множества вращающихся колб. Независимо от метода культивирования, основная цель — сделать выход продукта максимальным, и это достигается использованием подходящих векторов, экспрессионных систем и условий культивирования.

Таблица 6-1 Примеры различных типов биофармацевтических препаратов

Продукт	Примеры
Нуклеиновые кислоты	ДНК-вакцины Векторы для генной терапии Антисмысловые (или антисенс) олигонуклеотиды
Белки	Терапевтические белки (включая антитела) Диагностические антитела
Вирусы	Бактериофаги в качестве терапевтических агентов Вакцины Векторы для генной терапии
Клетки	Бактериальные вакцины Клетки для клеточной терапии

Таблица 6-2 Различные хозяева, используемые для производства биофармацевтических препаратов

Продуцент	Продукт
Бактерии (преимущественно <i>Escherichia coli</i>)	Терапевтические белки Бактериальные вакцины Бактериофаги для терапии Плазмидные ДНК для генной терапии и ДНК-вакцин
Дрожжи (преимущественно <i>Saccharomyces cerevisiae</i> и <i>Pichia pastoris</i>)	Терапевтические белки Вакцина против гепатита В
Животные клетки	Вирусы в качестве вакцин и векторов для генной терапии Терапевтические белки Моноклональные антитела для терапии и диагностики Клетки для клеточной терапии

Затем продукт должен быть экстрагирован и очищен; эта стадия называется **дальнейшей обработкой** (выделение и очистка целевого продукта). Поскольку конечный продукт — фармацевтический препарат, то все стадии производства должны осуществляться в соответствии с международными стандартами для высоких технологий (GMP, от англ. good manufacturing practice — надлежащая практика производства).

Примеры терапевтических белков, имеющих в настоящее время на рынке, приведены в табл. 6-3. Среди этих биофармацевтических препаратов моноклональные антитела уникальны тем, что находят самое разнообразное применение. Они используются для лечения рака и различных инфекций, кроме того, их можно метить радиоизотопами, чтобы диагностировать рак *in vivo* путем визуализации. Для лечения рака можно использовать сами антитела, а также конъюгаты с радиоизотопами или специально подобранными токсинами (см. гл. 5). Наконец, антитела могут быть «мышинными» (получены иммунизацией мышей); но разрабатываются и гуманизированные версии.

Таблица 6-3 Примеры терапевтических белков, которые в настоящее время имеются на рынке. Отметим, что среди них лишь незначительное число используется для лечения моногенных заболеваний (см. с. 122). Подробное описание номенклатуры терапевтических антител приведено в дополнении 6-1

Терапевтический белок	Клинические показания
Инсулин человека	Диабет
Гормон роста человека	Гипофизарная карликовость
Вакцина против гепатита В	Предупреждение инфицирования вирусом гепатита В
Интерферон альфа	Волосковоклеточный лейкоз

Табл. 6-3 (продолжение)

Терапевтический белок	Клинические показания
Активатор тканевого плазминогена	Острый инфаркт миокарда
Эритропоэтин	Анемия, связанная с почечной недостаточностью
Интерферон гамма	Хронический гранулематоз
Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор	Трансплантация костного мозга
Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор	Индукцированная химиотерапией нейтропения
Интерлейкин 2	Карцинома почечных клеток
Фактор VIII	Гемофилия А
ДНаза человека	Муковисцидоз
Глюкоцереброзидаза	Болезнь Гоше
Интерферон бета	Рассеянный склероз
Фактор IX	Гемофилия В
Консенсусный интерферон	Хроническая HCV-инфекция (вирус гепатита С)
Фактор роста тромбоцитов	Индукцированная химиотерапией тромбоцитопения
Полученный из тромбоцитов фактор роста бета	Диабетические язвы нижних конечностей
Рецептор фактора некроза опухолей, связанный с Fc фрагментом человеческого IgG 1	Ревматоидный артрит
Глюкагон	Гипогликемия
Фактор VIIa	Гемофилия
Моноклональные антитела	
Гемтузумаб	Острая миелоидная лейкемия
Ритуксимаб	Лимфома не-Ходжкина
Трастузумаб	Метастатический рак груди
Паливизумаб	Педиатрическая респираторно-синцитиальная вирусная инфекция
Инфликсимаб	Болезнь Крона и ревматоидный артрит
Базиликсимаб	Острое отторжение органа после трансплантации
Даклизумаб	Острое отторжение трансплантата почки
Эдреколомаб	Колоректальный рак
Абсиксимаб	Предотвращение тромбообразования
Муромомаб	Острое отторжение трансплантата почки

Дополнение 6-1 Названия моноклональных антител

Общие (несобственные) названия всех лекарств дают информацию о том, к какому классу химических соединений и классу терапевтических препаратов они принадлежат. Совет по присвоению названий США (USAN) принял следующие правила для наименования моноклональных антител.

1 Суффикс-маб используется для моноклональных тел и фрагментов.

2 Указывается источник антитела. Животное как источник — очень важный фактор безопасности при обсуждении возможности получения моноклонального антитела с целью лечения пациентов. Приняты следующие обозначения:

- а — крыса
- е — хомяк
- і — обезьяна
- о — мышь
- и — человек
- хi — химерный
- zu — гуманизированный

3 Общее название заболевания и его подкласс включены в несобственную часть имени:

- вирусное — -vir-
- бактериальное — -bac-

- иммуномодулятор — -lim-
- рак толстой кишки — -col-
- злокачественная меланома — -mel-
- рак молочной железы — -mam-
- рак яичка — -got-
- рак яичника — -gov-
- рак простаты — -pr(o)-
- рак — -tum-
- сердечно-сосудистое — -cir-

4 Определенный, совместимый с остальной частью слова слог выбирается в качестве начального префикса, чтобы создать уникальное имя.

5 Если продукт соединен с другим химическим соединением или несет радиоактивную метку, то добавляется второе слово.

Примеры:

Imicimab (имициромаб) — мышинное моноклональное антитело, используемое для детекции инфаркта миокарда

Daclizumab (даклизумаб) — гуманизированное моноклональное антитело, используемое для предотвращения отторжения органов

Basiliximab (базиликсимаб) — химерное моноклональное антитело, используемое для лечения отторжения органа

Производство моноклональных антител

Чужеродная макромолекула (**антиген**) в кровеносной системе высших позвоночных животных заставляет лимфоциты вырабатывать антитела, которые специфически связываются с макромолекулой для облегчения ее разрушения или уничтожения. Такие антитела найдены в глобулиновой фракции белков, которые циркулируют в крови и поэтому называются **иммуноглобулинами**. Все молекулы иммуноглобулинов имеют сходную базовую структуру, состоящую из двух тяжелых и двух легких цепей, связанных дисульфидными мостиками (рис. 6-1). Отдельные участки каждой цепи выполняют определенные функции. **Варибельные (V) участки** ответственны за связывание с антигеном. Внутри вариабельных областей имеются относительно константные каркасные области. Они, по-видимому, выступают в роли структурного остова для гипервариабельных участков, известных как **участки, определяющие комплементарность (CDR, от англ.**

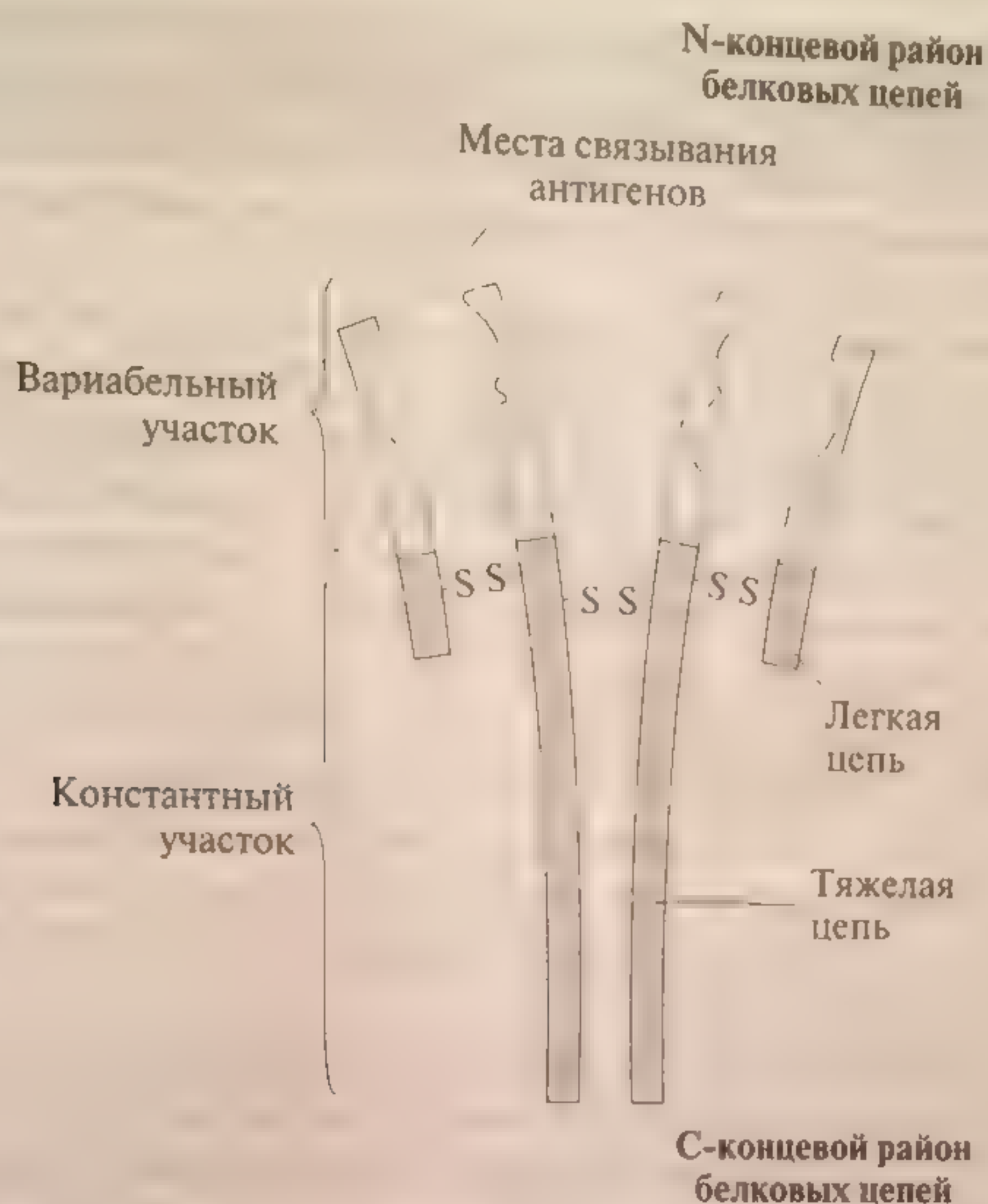


Рис. 6-1 Структура молекулы иммуноглобулина.

complementarity determining regions), которые в основном ответственны за специфичность антитела. Каждое из множества антител имеет свою аминокислотную последовательность и пространственное строение, и, вероятно, для антигена любой возможной формы иммунная система создаст соответствующее антитело. Если антитело обработать папаином, тяжелая цепь отщепляется с образованием трех фрагментов: два антиген-связывающих фрагмента (Fab) и фрагмент константного участка (Fc).

В ответ на неожиданное столкновение с новым антигеном иммунная система животного синтезирует ряд различных антител в зависимости от числа антигенных детерминант (эпитопов), расположенных на поверхности антигена. После индукции образования антител можно взять кровь этого животного и получить фракцию сыворотки. Однако такая сыворотка будет содержать все разнообразие антител, произведенных в ответ на антиген. Более того, эти антиген-специфические антитела будут разбавлены другими антителами, присутствующими в сыворотке животного в результате предыдущих столкновений с антигенами. Такая поликлональная антисыворотка не может быть использована в качестве биофармацевтического препарата, за исключением некоторых особых обстоятельств. Необходимы моноспецифические антитела, известные как **моноклональные антитела**. Они синтезируются **гибридомами**, которые получают слиянием антителообразующих лимфоцитов мыши с иммортализованными клетками

миеломы мыши (см. с. 181). Если все полученные после слияния гибридомы вырастить вместе, то получается поликлональная смесь антител. Поэтому выделяют клетки индивидуальных гибридом и проводят скрининг с целью выявления тех, которые продуцируют интересующие моноклональные антитела.

Клетки некоторых типов человеческих опухолей экспрессируют на своих поверхностях антигены, которые позволяют отличить раковые клетки от нормальных. Это делает опухоли потенциальными мишенями для антител, которые узнают опухолеспецифические поверхностные молекулы. Однако при использовании мышинных моноклональных антител для терапии рака, у пациентов часто возникают тяжелые иммунные реакции. Это происходит из-за образования **человеческих антимышиных антител (НАМА, от англ. human anti-mouse antibodies)**. Синтез НАМА происходит в течение 8–10 дней и достигает пика через 25–30 дней, препятствуя продолжению лечения. Идеальным решением было бы использование человеческих моноклональных антител, но попытки создать человеческие гибридомы оказались безуспешными.

При желании гены, кодирующие функциональные тяжелые и легкие цепи мышинных моноклональных антител, могут быть выделены из гибридомы. Функциональные гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи, можно также выделить из человеческих лимфоцитов. Путем обмена переменных участков (Fv) можно создать химерные гены. При введении этих генов в эукариотические клетки они начинают экспрессировать химерные антитела, которые приблизительно на 75% являются человеческими (содержание человеческого белка составляет 75%). Будучи менее иммуногенными, чем исходные мышинные антитела, химерные антитела все еще способны вызывать иммунные ответы (НАСА (англ.), ЧАХА — человеческие антихимерные антитела). Тем не менее химерные антитела используются для лечения рака, ревматоидного артрита и инфаркта миокарда.

Аминокислоты, которые фактически контактируют с эпитопом на антигене, преимущественно находятся в CDR. Можно перенести мышинные CDR в структуру человеческого антитела, создав таким образом **гуманизированное антитело**, которое более чем на 90% является человеческим (содержание человеческого белка в нем достигает 90%). Это не простая процедура, но уже несколько таких антител имеется на рынке. Конечная цель — получить полностью человеческое антитело, для достижения чего были разработаны два подхода. Первый из них — фаговый дисплей — описан в дополнении 6-2. Вторым подходом предполагается использование методов генной инженерии для выключения кластеров генов мыши, ответственных за синтез тяжелых и легких цепей антител, и замены их человеческими эквивалентами. Такие мыши продуцируют человеческие антитела, и при создании гибридом из их лимфоцитов можно получать человеческие моноклональные антитела.

Дополнение 6-2 Человеческие антитела, полученные с помощью фагового дисплея

Как показано на рис. Д6-2, переменные участки антител получены из сегментов различных генов. Переменный участок тяжелой цепи (антитела) человека составлен из следующих компонентов:

- 1 из возможных 65 сегментов V_H
- 1 из возможных 27 сегментов D
- 1 из возможных 6 сегментов J

Такая комбинация позволяет создавать около 10 000 различных переменных районов тяжелой цепи. Переменный участок легкой цепи (антитела) человека составлен из следующих компонентов:

- 1 из возможных 40 сегментов V_L
- 1 из возможных 5 сегментов J

Эти индивидуальные сегменты могут быть изолированы и клонированы в экспрессионном векторе. В антителе V_H и V_L являются частями различных полипептидных цепей. Однако оказалось, что можно экспрессировать переменные районы тяжелой и лег-

кой цепей в качестве частей одной и той же полипептидной цепи и создавать функциональные антиген-связывающие белки. Эти мини-антитела известны как одноцепочечные переменные фрагменты (ScFv).

Путем слияния генов, кодирующих ScFv, с геном белка оболочки бактериофага M13 стало возможным создание библиотеки бактериофагов, в которой различные фаговые частицы экспрессируют различные молекулы ScFv. Этот метод известен как фаговый дисплей. Если библиотекой фагов ScFv обработать иммобилизованный антиген, то с ним свяжутся только те фаги, которые экспрессируют комплементарные ScFv. Эти фаги можно выделить и нарастить. Гены V_H и V_L из отобранных ScFv выделяют из фагового генома и используют для реконструкции полного антитела аналогично процессу создания химерного антитела.

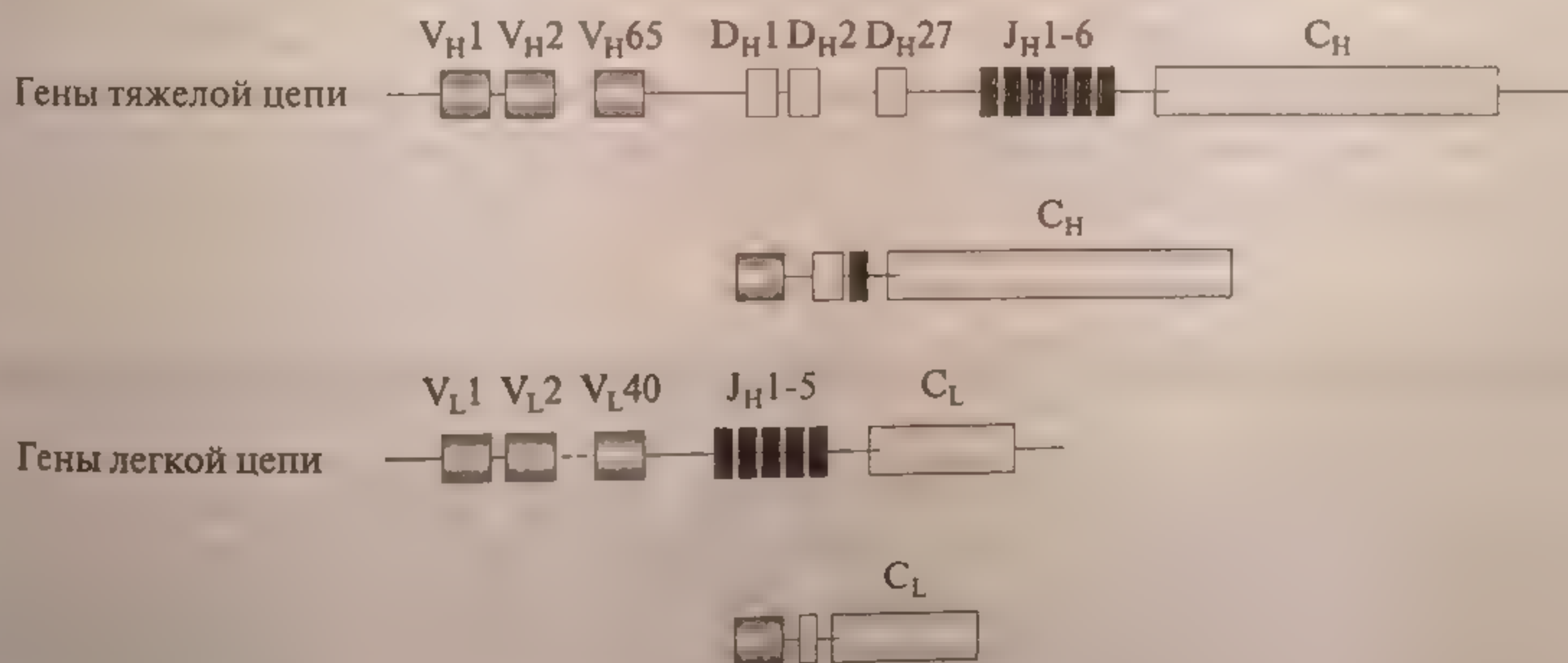


Рис. Д6-2 Упрощенная генетическая схема создания антител.

Радиоиммунотерапия и диагностическая визуализация

Число противораковых антител, пригодных для лечения различных форм рака, растет. Первоначально пациенты реагируют удовлетворительно, наблюдается заметное уменьшение опухолей, однако в значительном ряде случаев опухоли становятся устойчивыми после 3–6 месяцев лечения. Один из путей, позволяющий минимизировать эту проблему, — присоединение ра-

диоизотопов к антителу. Когда несущее радиоактивную метку антитело связывается с опухолевым эпитопом, расположенные рядом клетки подвергаются локальному облучению. Ясно, что это гораздо менее вредно для пациента, чем внешнее облучение. Для целей радиоиммунотерапии наиболее подходящим является иттрий-90, поскольку энергии излучаемых им частиц достаточно, чтобы вызвать гибель клеток, но только в месте расположения опухоли. Альтернативный путь получения радиоактивно меченных противопухолевых антител — использование технеция-99m или индия-111. Излучение этих изотопов достаточно сильное, чтобы обнаруживать его вне тела с помощью специальной камеры. Этот метод известен как гамма-сцинтиграфия и может быть использован для точной локализации опухолей.

Другие модифицированные антитела

Помимо радиоиммунотерапии есть другой путь повышения киллерной активности противоракового антитела — присоединение к нему клеточного токсина. После связывания иммунотоксинового конъюгата с поверхностью раковой клетки, он переносится внутрь клетки, где оказывает свое вредное воздействие. Токсины, используемые для этих целей, включают ризин (необратимо изменяет рибосомы), дифтерийный токсин, экзотоксин *Pseudomonas*, калихеамицин. Цитокины, такие как фактор некроза опухоли и интерлейкин 2, также присоединяли к антителам, чтобы повысить смертоносное действие последних на раковые клетки. В этом случае идея заключается в увеличении концентрации цитокина вблизи опухоли таким образом, что происходит запуск иммунной системы, которая начинает разрушать опухоль.

Крупномасштабное культивирование микроорганизмов

Крупномасштабное культивирование микроорганизмов часто называют промышленной ферментацией. Строго говоря, ферментация — это биологический процесс, протекающий в отсутствие кислорода, но этот термин в настоящее время применяется к любому крупномасштабному культивированию микроорганизмов, даже несмотря на то что большинство из них аэробные. По иронии судьбы снабжение кислородом — единственный наиболее важный фактор, оказывающий влияние на эффективность аэробных процессов. И дизайн современного ферментера, и основная задача, которая стоит перед технологами-практиками, направлены на обеспечение подачи необходимого количества кислорода. Факультативные анаэробы могут расти в отсутствие кислорода, но с меньшей скоростью, и выход клеточной массы и продукта при этом существенно снижен.

Быстрорастущие культуры испытывают очень большую потребность в кислороде, причем кислород должен быть растворен в среде роста так, чтобы взаимодействовать с электронно-транспортной системой мембран.

Основная проблема снабжения кислородом в достаточном количестве заключается в том, что кислород малорастворим в водных системах, т. е. его растворимость составляет только 7 мг/л при 35°C и давлении 1 атм. Более того, его растворимость снижается по мере повышения температуры и увеличения концентрации растворенных веществ. В случае малых объемов, например менее 1 л культуральной жидкости, снабжения необходимым количеством кислорода можно достичь при выращивании культуры в колбе Эрленмейера при постоянном встряхивании (перемешивании). Встряхивание способствует переносу кислорода из газовой фазы в жидкую. Если объем среды роста не превышает 10–20% объема колбы, то можно достичь плотности клеток в культуре, равной 1–2 г сухой массы/л, прежде чем кислород станет лимитирующим фактором. Если клеточная плотность превысит этот уровень, то скорость утилизации кислорода обгонит скорость его переноса в жидкую фазу.

Для крупномасштабного культивирования и/или для получения более высокой плотности клеток потребность культуры в кислороде может быть удовлетворена только с помощью интенсивной аэрации. На практике это осуществляется путем пропускания через культуру воздуха. Эффективность, с которой кислород переносится из воздушных пузырьков в жидкую фазу, в основном зависит от двух параметров: отношения площади поверхности воздушных пузырьков к их объему и времени удерживания пузырьков в жидкости. Чем меньше пузырьки, тем больше отношение площади поверхности к объему и тем сильнее перенос кислорода. Аналогично, чем дольше пузырьки находятся в жидкости, тем большее количество кислорода диффундирует из пузырька в жидкость. Один из путей уменьшения размера пузырьков — введение воздуха через барботер с многочисленными маленькими отверстиями, а не через одно отверстие большого размера. Второй путь — интенсивно перемешивать культуру с помощью мешалки. Перемешивание имеет два дополнительных преимущества. Время удерживания пузырьков возрастает, так как к поверхности жидкости они перемещаются не по прямой, а по извилистой траектории. Кроме того, перемешивание способствует переносу кислорода из жидкости к поверхности клеток. Перемешивание обычно осуществляют с помощью импеллера Раштона (рис. 6-2), так как он более эффективен для получения пузырьков меньшего размера, чем винтовой пропеллер. Число лопастей у импеллера и их размеры относительно размеров ферментера сильно влияют на эффективность переноса кислорода.

Из сказанного выше ясно, что главное в конструкции ферментера — закрытый сосуд, снабженный системой подачи воздуха, и мешалка; однако необходимо еще обеспечить протекание множества других функций; некоторые из них приведены в табл. 6-4. Эти требования включены в принципиальную схему цилиндрического реактора с механическим перемешиванием (рис. 6-3). Реакторы изготавливают из нержавеющей стали очень высокого качества, чтобы не происходило коррозии или проникновения токсических металлов в виде солей в культуральную среду. Для успешной ферментации ключевым требованием является

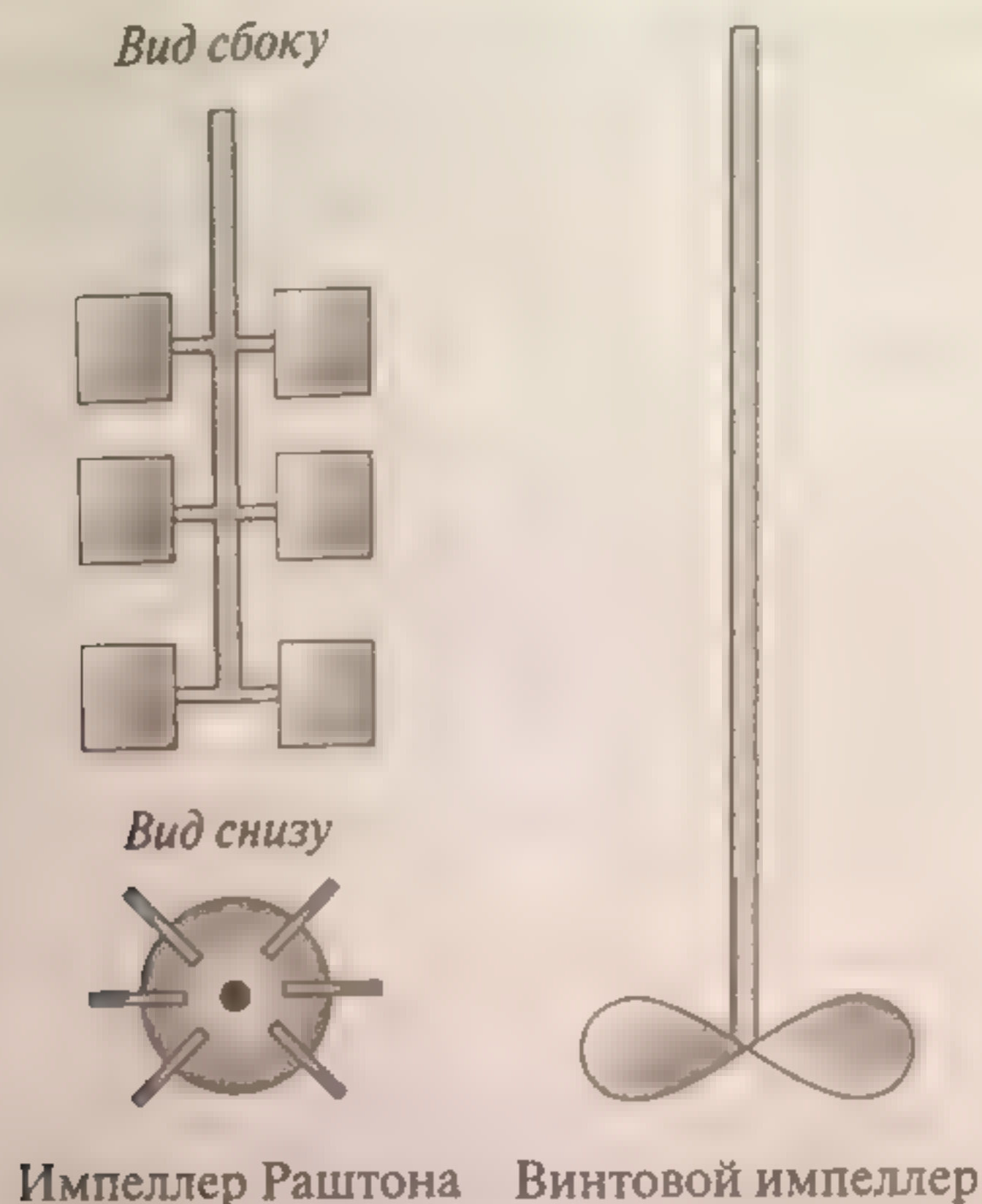


Рис. 6-2 Схематическое изображение винтового импеллера и шестилопастного импеллера Раштона.

обеспечение асептических условий, предупреждающих контаминацию культуры. Таким образом, весь ферментер и вспомогательное оборудование, а также питательная среда должны быть стерильными до инокуляции. На практике стерилизация всего оборудования осуществляется *in situ* с помощью нагретого водяного пара. Питательную среду стерилизуют нагреванием в ферментере путем подачи струи перегретого водяного пара через охлаждающие змеевики и кожух. Кроме того, воздух,

Таблица 6-4 Некоторые особенности конструкции ферментеров

Особенность	Объяснение
Перегородки	Повышают эффективность переноса кислорода путем увеличения турбулентности перемешиваемой культуральной среды
Контроль вспенивания	Перемешивание и аэрация культуральной среды может вызывать излишнее вспенивание, особенно при высоких плотностях клеток и/или если используются сложные добавки (например, дрожжевой экстракт)
Контроль pH	Метаболизм большинства организмов вызывает изменение pH культуральной среды. Обычно pH среды непрерывно контролируют, поддерживая постоянным путем добавления кислоты или щелочи
Контроль температуры	Сначала культуральную среду необходимо нагреть до нужной температуры культивации. Однако микроорганизмы выделяют тепло в процессе переработки субстратов, и по мере возрастания плотности клеток появляется необходимость охлаждения культуральной среды
Дополнительные входные отверстия	Должны быть приняты меры для обеспечения введения инокулята и компонентов среды

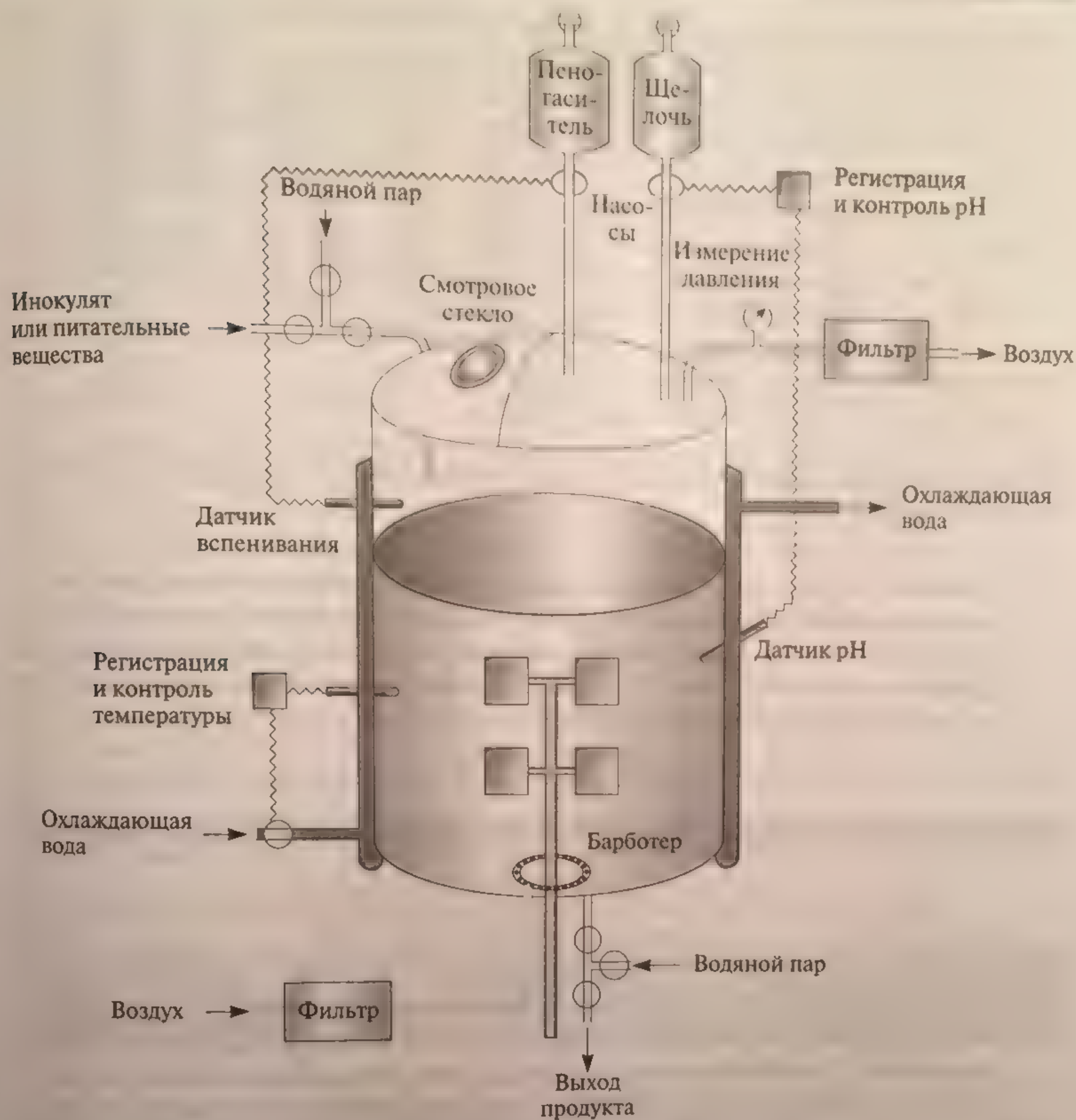


Рис. 6-3 Схема цилиндрического реактора с перемешиванием. Для простоты не показана конструкция соединения вала мешалки и корпуса ферментера и не изображены перегородки.

подаваемый во время ферментации также должен быть стерильным, что достигается фильтрацией. Наконец, в ферментере не должно быть трещин, допускающих проникновение микроорганизмов.

Любая ферментация начинается с чистой емкости, стерилизованной и заправленной стерильной средой. Затем нужно провести инокуляцию. Объем инокулята (посевого материала) обычно составляет 1–10% общего объема среды. Если он меньше, то лаг-период, предшествующий началу роста, может оказаться более длительным, а период ферментации слишком затянутым. Для малого ферментера с рабочим объемом 10–20 л в

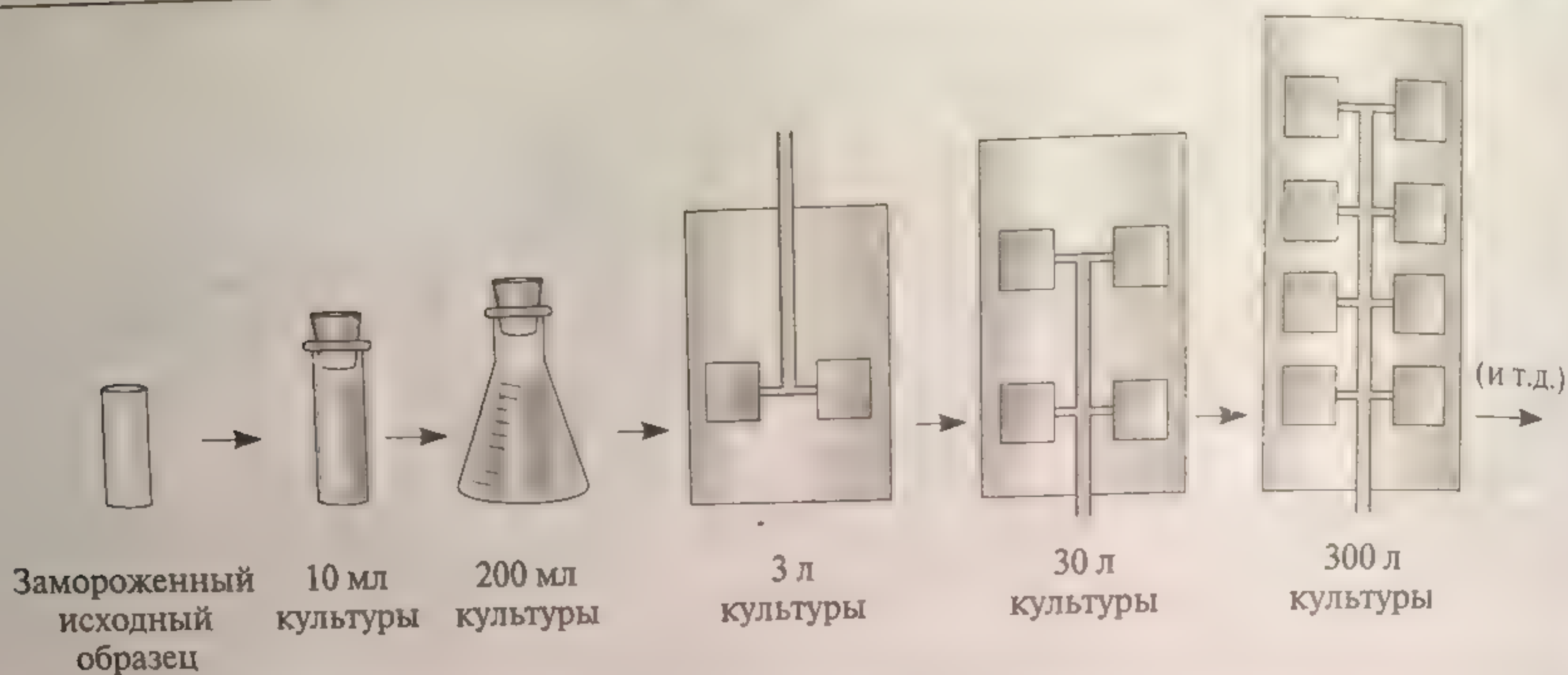


Рис. 6-4 Серия ферментаций, используемая для получения большого инокулята для производственного ферментера.

качестве посевного материала может быть использована культура, выращенная в колбе Эрленмейера. Если объем ферментера превышает указанный, необходимо приготовить инокулят в малом ферментере. В случае ферментера очень большого размера может понадобиться серия последовательных пересевов (рис. 6-4).

Крупномасштабное культивирование животных клеток

Прежде чем начать обсуждение методов выращивания животных клеток, необходимо рассмотреть различные типы животных клеток, используемых для производства биофармацевтических препаратов. Кусочек свежей ткани может быть разделен на составляющие его клетки путем обработки протеолитическим ферментом, таким как трипсин. Если эти клетки поместить в подходящую среду роста, они прикрепятся ко дну сосуда и начнут делиться. Культура этого типа, полученная непосредственно из дифференцированной ткани, называется **первичной культурой**. В конечном итоге, дно культурального сосуда окажется покрыто непрерывным слоем клеток, чаще всего толщиной в одну клетку, который называется **монослоем**. Клетки первичных культур можно отделить от культурального сосуда и использовать для инициации вторичных культур путем пересевания в свежие среды. Этот процесс можно повторить несколько раз, но клетки, в конце концов, погибают после 40–80 генераций.

Не все животные дают первичные культуры, у которых все клетки-потомки умирают. В культурах клеток мышей несколько клеток изменяются таким образом, что приобретают другую морфологию, растут быстрее и способны дать культуру из меньшего числа клеток. Потомки, полученные от таких необычных клеток, имеют неограниченную продолжительность жизни и называются **клеточными линиями**. При повторяющихся последова-

тельных пересевах клеточных линий их культуральные свойства могут подвергаться сильным изменениям. Например, плотность, при которой прекращается деление, может увеличиться так, что клетки начинают расти слипшимися комками, а не монослоями, и могут быть беспорядочно ориентированы друг относительно друга. Такие клеточные линии называют **трансформированными**. Они, как правило, **неопластические**, т. е. вызывают рак будучи трансплантированы в родственные организмы (см. гл. 5). Линии трансформированных клеток также могут быть получены из периферических лимфоцитов при инфицировании последних онкогенными вирусами, такими как вирус Эпштейна–Барра; этот процесс называется иммортализацией. Возможность относительно легко иммортализовать клетки — чрезвычайно ценное свойство, так как позволяет неограниченно размножать клетки из индивидуумов со специфическими генетическими мутациями (дополнение 6-3). Достоверных данных о получении клеточных линий человека из нормальных клеток нет, тем не менее несколько линий было получено из человеческих опухолей. По-видимому, обладание канцерогенным фенотипом обеспечивает более легкую адаптацию к росту в клеточной культуре. Свойства ряда клеточных линий, нашедших применение в производстве биофармацевтических препаратов, показаны в табл. 6-5.

Тенденция клеточных линий постоянно меняться при повторной культивации заставляет хранить клеточные образцы в замороженном состоянии. Клетки смешивают с добавками, такими как глицерин или диметилсульфоксид (чтобы свести к минимуму повреждение клеток кристаллами льда), распределяют по ампулам и хранят в жидком азоте. Клетки, поддерживаемые таким образом, остаются жизнеспособными в течение многих лет и после размораживания легко иницируют новые культуры.

Дополнение 6-3 Иммортализованные клетки в генетических исследованиях

Картирование генетического дефекта, а также идентификация и выделение поврежденного гена — это длительный процесс (см. гл. 4), требующий значительных количеств клеточного материала, полученного от пациента. Часто невозможно или нежелательно обращаться к пациенту за новой порцией ткани. Возможность иммортализовать лимфоциты решает эту проблему, так как небольшая порция крови может послужить источником неограниченного количества материала. Путь иммортализации описан ниже.

У пациента берут небольшое количество крови. Лимфоциты отделяют от эритроцитов в градиенте плотности полимера фиколла. Лимфоциты промывают и ресуспендируют в культуральной среде высокой плотности, а

затем добавляют вирус Эпштейна–Барра. Инфицированные клетки растут в суспензионной культуре, и В-лимфоциты, трансформированные вирусом, начинают образовывать визуально различимые агрегаты клеток. В конце концов Т-лимфоциты и нетрансформированные В-лимфоциты погибают, и выживают только трансформированные клетки (лимфобластоидные клетки). Лимфобластоидную клеточную линию размножают путем последующего культивирования в больших объемах свежей среды, делят на аликвоты и хранят в замороженном состоянии. Если в дальнейшем необходимо получить еще больше клеток, то наращивают в свежей среде субкультуру из замороженной аликвоты.

Таблица 6-5 Некоторые клеточные линии, используемые для производства биофармацевтических препаратов

Клеточная линия	Организм-источник	Ткань	Рост в суспензии
CHO	Китайский хомяк	Яичник	Да
BHK21	Сирийский хомяк	Почки	Да
NSO	Мышь	Миелома	Да
SP2/0	Мышь	Миелома	Да

Один из наиболее важных факторов достижения успешного культивирования клеток млекопитающих *in vitro* — это состав питательной среды. Критерии, которым должна удовлетворять среда, указаны в табл. 6-6. Обычно используемые питательные среды имеют сложный состав, как правило, не полностью определенный из-за присутствия сыворотки крови. Роль сыворотки выяснена не до конца. Некоторые компоненты сыворотки (например, α -глобулины и гормоны) могут оказывать благотворный эффект, содействуя прикреплению и распределению клеток по поверхности, а также стимулируя клеточное деление. Наиболее распространенный источник сыворотки — зародыши телят, так как эта сыворотка обеспечивает лучший рост культивируемых клеток, чем сыворотка из взрослых животных. Сыворотка зародышей телят слишком дорого стоит и, как правило, малодоступна. Сыворотку, используемую в производстве биофармацевтических препаратов, следует получать от надежных поставщиков, которые строго контролируют качество продукции. Более того, сыворотка должна быть получена от животных, проверенных на отсутствие прионов бычьей губчатой энцефалопатии (БГЭ). По этой причине множество усилий было направлено на разработку бессывороточных сред для широкомасштабного использования. Такие среды в настоящее время используются для производства терапевтических белков в суспензионных культурах.

Среды, используемые для культивирования животных клеток, богаты питательными веществами, поэтому они особенно подвержены загрязнению (контаминации) бактериями и грибами, если не практикуются хоро-

Таблица 6-6 Требования к питательной среде для успешного культивирования животных клеток

- 1 Среда должна обеспечивать все потребности клеток в питании
- 2 В среде должно поддерживаться постоянное значение pH 7,0–7,3 независимо от выделения кислоты, т. е. она должна содержать буферные компоненты
- 3 Среда должна быть изотонична клеточной цитоплазме
- 4 Среда должна быть стерильной



шие методы создания асептических условий. Поскольку потеря крупномасштабной культуры слишком дорого обходится, обычно для обеспечения дополнительной защиты добавляют антибиотики. Другая проблема, связанная с клеточными культурами, — контаминация микоплазмами, которые представляют собой группу бактерий без клеточных стенок. Большинство загрязняющих микоплазм непатогенны и, по-видимому, попадают в среды из ротовой полости кого-либо из обслуживающего персонала, но в некоторых случаях источником является сыворотка. Микоплазмы также можно ингибировать антибиотиками.

Выбор метода для крупномасштабного выращивания животных клеток, зависит от того, требуют ли они присоединения к твердой поверхности (опорно-зависимые) или могут расти в суспензии. Выращивание в суспензии не сопряжено с большими сложностями, так как можно использовать стандартные ферментеры. Ферментеры проектируют таким образом, чтобы были обеспечены асептические условия и чтобы они были оборудованы приспособлениями для подачи газа и контроля pH. Мотор мешалки должен быть не слишком мощным, чтобы обеспечить достаточно низкую скорость перемешивания для предотвращения нежелательных эффектов отрыва клеток. Альтернативный метод культивирования клеток — использование эрлифтного ферментера (рис. 6-5а), в котором поток пузырьков газа обеспечивает перемешивание среды, достаточное для обмена метаболитами и не вызывающее повреждения



Рис. 6-5 Различные системы для крупномасштабного выращивания животных клеток. а — эрлифтный ферментер; б — система с мембранами на основе полых волокон.

клеток. Совсем недавно были разработаны одноразовые системы культивирования, предполагающие использование стерильных емкостей для хранения сред. В эти емкости добавляют инокулят и встряхивают на качающейся платформе.

Выращивание опорно-зависимых клеток в большом масштабе особенно затруднено, так как ферментер не обеспечивает необходимого достаточно высокого отношения площади поверхности к объему. Был разработан ряд альтернативных методов. Выбор метода зависит в определенной степени от цели использования клеток, и отчасти от того, какие имеются в распоряжении денежные средства. Самая простая система — использование вращающихся сосудов (роллерных бутылей) объемом от 500 мл до 50 л. Их наполняют на одну двадцатую объема средой, добавляют клетки, которые закрепляются на стенках при медленном вращении. Во время вращения бутылей растущий монослой периодически то погружается в жидкость, то оказывается на воздухе. Таким образом, клетки автоматически обмываются питательными веществами и подвергаются действию кислорода, и движение жидкой среды обеспечивает равномерное распределение ее компонентов. Как можно легко видеть, работа в большом масштабе с вращающимися бутылками технологически проста, но трудоемка на стадии становления культуры и начальных стадиях последующего процессинга. Разработан ряд запатентованных систем, которые устраняют трудности работы с роллерными бутылками. По сути, это стопки плоских камер, каждая с площадью поверхности в 632 см^2 и со стандартными входными и выходными отверстиями. Стопка из 40 камер эквивалентна 14 большим роллерным бутылкам, но заполнение и опустошение всей стопки осуществляется за одну операцию, а не за 14, как в случае бутылей.

Были разработаны два альтернативных метода для выращивания клеток в большом масштабе, когда требуется прикрепление клеток к поверхности. В одном из них используются шариковые микроносители из декстрана или синтетических полимеров. Шарик имеет диаметр 50–200 мкм, и их добавление в ферментер сильно увеличивает отношение площади поверхности к объему. Еще лучше использовать пористые микроносители, так как они могут обеспечивать более высокую плотность клеток при том, что носитель защищает клетки от повреждения при перемешивании, необходимом для поддержания шариков во взвешенном (суспендированном) состоянии. Другой метод выращивания прикрепленных клеток основан на использовании мембран из полых волокон (рис. 6-56). Этот метод применяют для культивирования клеток в малом масштабе, но иногда и в промышленном производстве.

Экспрессионные системы

Основная задача крупномасштабного производства — достигнуть максимального выхода продукта (так как более высокие выходы повышают экономичность процесса), а также упростить процедуру удаления

загрязнений. Поэтому молекулярные генетики, основываясь на знаниях механизмов репликации векторов и систем контроля транскрипции, разрабатывают штаммы, в которых экспрессия желаемого продукта существенно повышена. Сообщалось, что были достигнуты выходы плазмидной ДНК (для генной терапии) и терапевтических белков в *Escherichia coli* 250 мг/л и 2 г/л, соответственно. В случае антител, полученных в культивированных клетках животных, выходы составляют 250–750 мг/л. Однако суперэкспрессия несущественных клеточных компонентов (желаемого продукта) — это большая энергетическая нагрузка на клетки-продуценты, поэтому идет мощный отбор спонтанных мутантов, которые продуцируют гораздо меньше плазмиды или терапевтического белка. Чем длиннее серия пересевов (рис. 6-4), тем больше число клеточных делений и больше риск, что в последнем сосуде с культурой клеток будет доминировать мутант, дающий низкий выход продукта. По этой причине, как правило, используется штамм, в котором генная экспрессия может регулироваться условиями внешней среды. Например, при использовании в качестве хозяина-продуцента *Pichia pastoris* ген желаемого белка помещают под контроль промотора метанол-оксидазы. Клетки культивируют в отсутствие метанола до нужной плотности в конечном ферментере. Затем добавляют метанол, и начинается быстрый лавинообразный синтез продукта.

На выход рекомбинантных продуктов влияют три основных фактора. Первый из них — число копий соответствующего гена. Если ген находится в плазмиде, то амплификация гена достигается использованием плазмиды с высокой копийностью. Имеется большое количество различных клонирующих векторов с очень высокой копийностью, но в случае суперэкспрессии белков будет идти отбор мутантов с низкой копийностью. На практике есть возможность снижать или увеличивать число копий плазмиды путем варьирования условий культивации в ферментере, т. е. изменяя состав среды и температуру. Следует также отметить, что чем больше размер встроенного гена и чем больше в результате плазмиды, тем ниже копийность.

Второй фактор, который может влиять на выход продукта, — выбор промотора для генной экспрессии. Было разработано множество различных высокоэкспрессирующих промоторов, но большинство из них пригодны лишь для маломасштабных лабораторных экспериментов. Чтобы промотор можно было использовать в крупномасштабном производстве, он должен быть легко регулируемым внешними (внеклеточными) факторами, как в случае упомянутой выше метанол-оксидазы.

Третий фактор, влияющий на выход продукта и наименее изученный генетиками, — это способ культивирования. Чтобы достичь максимального выхода продукта, обычно оптимизируют выход клеток. Поскольку большая часть АТФ продуцируется за счет окислительного метаболизма, а не за счет ферментативного, очень важно, чтобы во время культивирования клеток не было недостатка в кислороде. Это объясняет необходимость хороших систем аэрации (см. с. 176). Однако если концентрация пита-

тельных веществ слишком высокая, клетки могут переключиться на ферментативный путь даже в присутствии избытка кислорода. Например, при высоких концентрациях глюкозы у *Saccharomyces cerevisiae* проявляется эффект Крэбтри, посредством чего происходит переключение на ферментацию спирта. Аналогично *Escherichia coli* метаболизирует сахар только до ацетата. Поэтому сахара и другие источники углерода обычно добавляются в малых количествах через равные промежутки времени (процесс, известный как периодическая подкормка). Поскольку ферментативный метаболизм также может уменьшать копийность плазмиды и экспрессию генов, то можно изменить условия роста, чтобы свести к минимуму образование продукта, а следовательно, и нестабильность штамма, вплоть до стадии наращивания клеток в последнем сосуде.

Дальнейшие производственные процессы

Как только клеточная культура получена, необходимо выделить целевой биофармацевтический препарат. Как минимум, это включает отделение клеток от питательной среды (например, в случае бактериальных вакцин), но чаще всего требуется очистка продукта, сопровождаемая или не сопровождаемая разрушением клеток (рис. 6-6). Некоторые клетки быстро осаждаются из суспензии, как только прекращаются аэрация и перемешивание. Но чаще всего осаждение клеток проводят центрифугированием. Из-за больших объемов жидкости, характерных для крупномасштабного производства, необходимо использование центрифуг непрерывного действия (рис. 6-7). Альтернативой центрифугированию является ультрафильтрация. При ультрафильтрации раствор продавливается через мембрану с очень малыми размерами пор (обычно менее 0,5 мкм), в результате чего на ней задерживаются частицы, значительно превышающие по

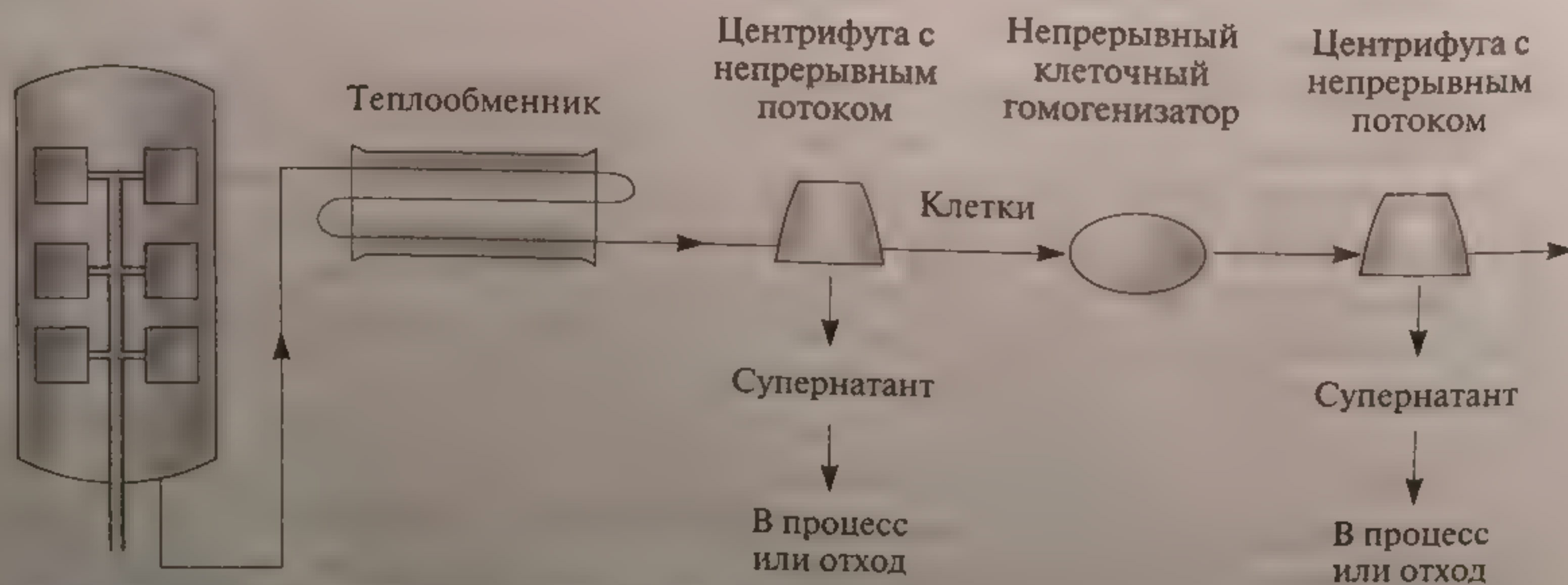


Рис. 6-6 Схема типичных операций по обработке ферментирующей среды. Если целевой продукт находится в среде, удаляют клетки. Если продукт находится внутри клеток, то может потребоваться их гомогенизация для экстракции продукта.

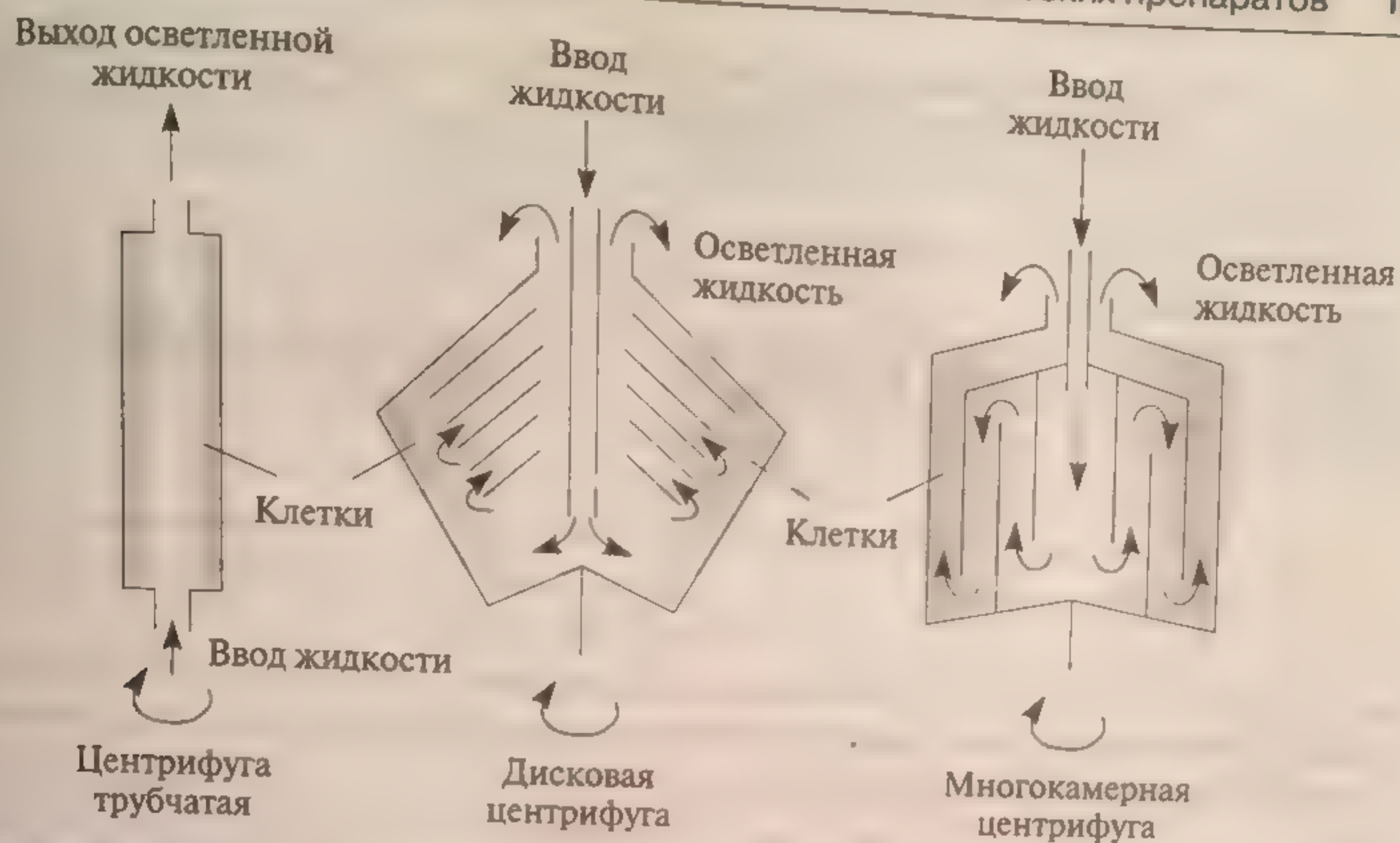


Рис. 6-7 Три широко используемые конструкции центрифуг непрерывного действия.

своим размерам молекулы растворителя. Неудивительно, что при таких малых размерах пор при прохождении жидкости огромное сопротивление и приемлемые скорости протекания достигаются только под давлением и в случае высокого отношения площади поверхности к объему. Белки, секретируемые клетками-продуцентами, могут либо задерживаться, либо не задерживаться, в зависимости от размеров пор мембраны.

Если целевой продукт остается внутри клетки, то для его освобождения необходимо клетку разрушить. Известны многие методы разрушения клеток в лабораторных условиях, однако большинство из них невозможно использовать в промышленных масштабах. Два наиболее подходящих для этого случая метода — гомогенизация под высоким давлением и использование шаровых мельниц. При гомогенизации под высоким давлением клеточные суспензии перемещаются из области высокого давления в область низкого давления, проходя через маленькое отверстие. В результате взрывной декомпрессии клетки разрываются и процесс облегчается за счет удара с большой скоростью о части гомогенизатора (рис. 6-8). Высокоскоростные шаровые мельницы — это мешалки, состоящие из центрального стержня, на который серия круглых дисков эксцентрично насажена таким образом, что они образуют спираль. Емкость наполняется очень маленькими стеклянными шариками перед помещением в нее клеточной суспензии. Именно трение о быстро движущиеся шарики вызывает разрушение клеток.

После разрушения клеток следует удалить их осколки (клеточный дебрис). Как и при удалении неразрушенных клеток, наиболее широко используются методы центрифугирования и ультрафильтрации. После такого «осветления» проводят ряд стадий очистки для получения желаемого продукта. Конкретные процедуры в значительной мере зависят от специ-

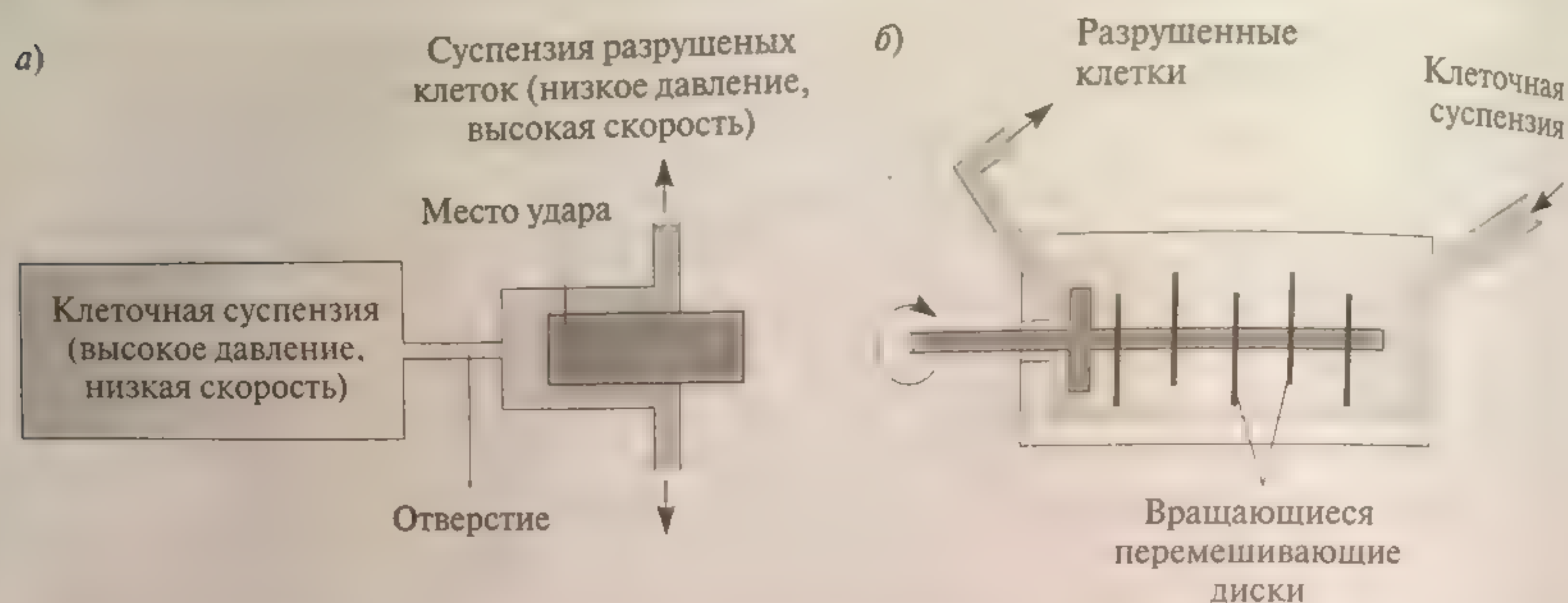


Рис. 6-8 Схема оборудования, используемого для непрерывного разрушения клеток (см. подробности в тексте). (а) Гомогенизатор высокого давления. (б) Высокоскоростная шаровая мельница (шарики для простоты не показаны).

фического продукта и характера примесей (табл. 6-7), но в основном очистку проводят в три этапа. На первом этапе продукт концентрируют путем «посадки» на какой-либо носитель, например на ионообменную смолу. На следующем этапе, который может включать несколько стадий, удаляется большая часть примесей. На последнем этапе избавляются от всех следовых количеств загрязнений и различных соединений. Следует отметить, что некоторые белки при суперэкспрессии в бактериях типа *E. coli* образуют тельца включения, состоящие из агрегатов белка. Белок, находящийся в тельцах включения, необходимо солиubilизировать с помощью денатурирующих агентов, таких как 7 М мочевины или гуанидингидрохлорид, а затем ренатурировать перед очисткой. Некоторые белки, такие как эпидермальный фактор роста, ренатурируют очень легко, но в других случаях полностью активный белок регенерировать невозможно.

Таблица 6-7 Возможные примеси в биофармацевтических препаратах

Источник примесей	Тип примесей
Хозяин	Вирусы (из клеток животного-хозяина) Белки и ДНК из клеток хозяев Варианты белков с изменениями в характере гликозилирования или других посттрансляционных модификаций Варианты белков, в которых N- и C-концы повреждены Эндотоксины (из грамотрицательных бактерий-хозяев)
Продукт	Денатурированный белок Конформационные изомеры Белковые агрегаты, вызванные неправильным фолдингом или неправильным поперечным «сшиванием»
Процесс	Компоненты питательной среды (в частности, белки сыворотки) Реагенты, используемые при очистке, включая материалы хроматографических носителей Металлы

Многие процедуры очистки, используемые в лабораторных условиях, непригодны для крупномасштабного производства. Хороший пример — очистка плазмидной ДНК. В лабораториях для выделения плазмидной ДНК широко распространен мягкий лизис клеток лизоцимом и додецилсульфатом натрия (ДСН) с последующим осаждением клеточного дебриса центрифугированием для получения «прозрачного лизата». Затем супернатант смешивают с хлоридом цезия и этидийбромидом и подвергают ультрацентрифугированию в градиенте плотности. В качестве альтернативы клеточный экстракт можно подвергнуть экстракции фенолом и хлороформом с последующей ионообменной или обращеннофазовой хроматографией. Эти процедуры не пригодны для получения векторов для генной терапии или ДНК-вакцин: либо невозможно увеличить масштаб (центрифугирование в градиенте плотности), либо используются химические реагенты, которые неприемлемы для производства фармацевтических препаратов, предназначенных для инъекций (ДСН, фенол, хлороформ). Вместо этого клетки разрушаются методами, указанными на рис. 6-8, а плазмидная ДНК очищается ионообменной хроматографией с использованием реагентов, которые в целом рассматриваются как безопасные (generally recognized as safe, GRAS).

Генетические манипуляции для облегчения процедур очистки биофармацевтических препаратов

Многие «чужеродные» белки, синтезируемые в новой хозяйской клетке, например в *E. coli*, подвергаются атаке протеазами с N- или C-конца. Эти укороченные белки часто обнаруживаются в виде примесей к интактному белку, и их присутствие в конечном продукте нежелательно. Синтез желаемого белка в составе слитого с другим белком продукта может предотвратить отщепление концов. Получение слитых белков может также облегчить очистку. Один из первых примеров использования слитых белков для очистки — присоединение полиаргининовых «хвостов». В этом методе последовательность гена, кодирующего желаемый белок, удлиняется с 3'-конца добавлением нескольких аргининовых кодонов. Когда такие гены экспрессируются, результирующие белки имеют полиаргининовый «хвост» или tag (аффинный ярлык), который делает белки более основными. При ионообменной хроматографии такие белки отделяются от большей части более кислых белков хозяйской клетки (рис. 6-9). Полиаргининовый участок затем удаляют ферментом карбоксипептидазой В, которую для удобства можно иммобилизовать. Затем полученный белок заново подвергают хроматографии на такой же ионообменной смоле для отделения оставшихся примесей более основных белков.

Примеры других широко используемых аффинных ярлыков для очистки: глутатион-S-трансфераза, белок MalE (связывающий мальтозу) из *E. coli* и несколько остатков гистидина. Однако в каждом из этих случаев

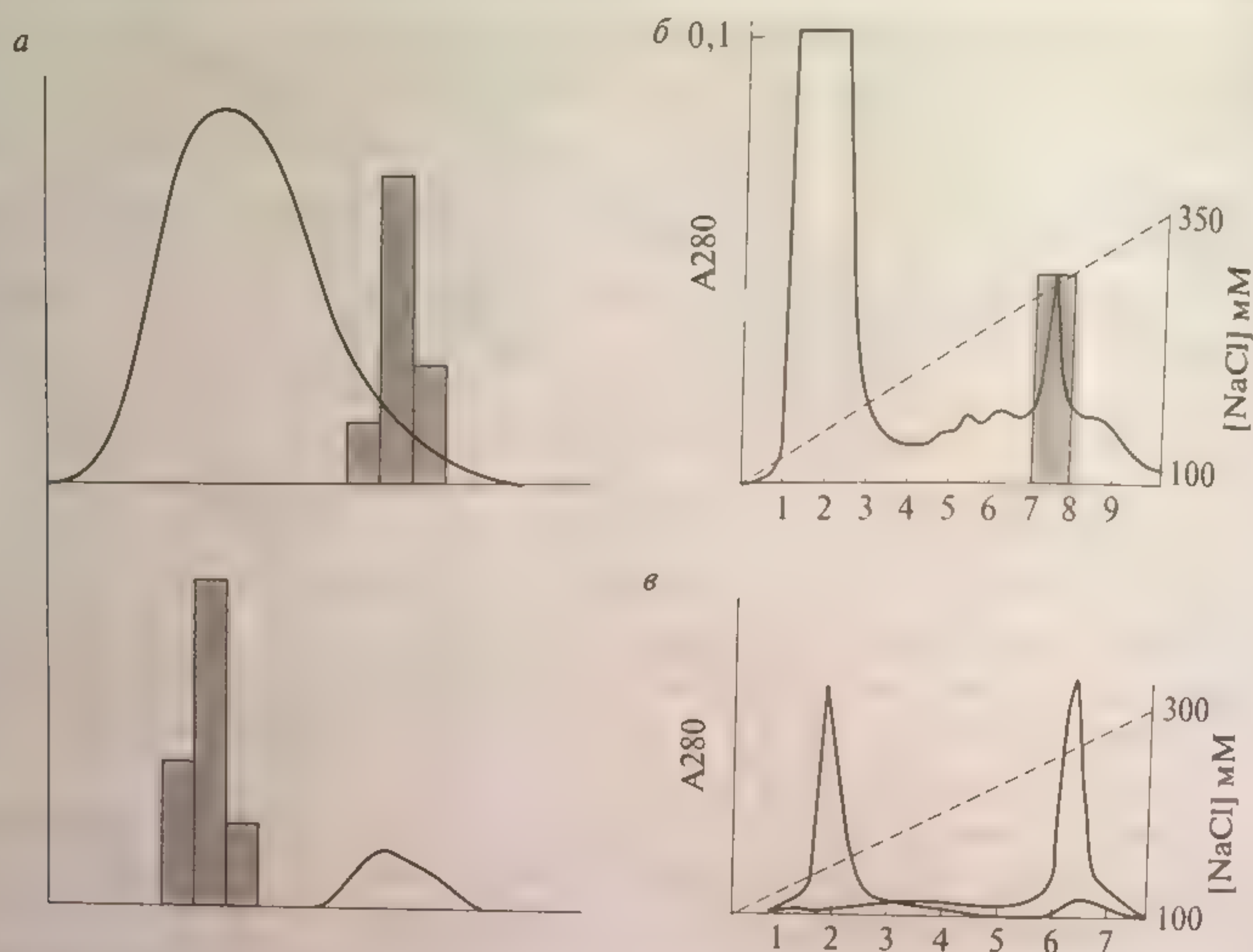


Рис. 6-9 Использование полиаргининового «хвоста» для облегчения очистки белка. *а* — презентация гипотетического белка до и после удаления С-концевых аргининовых остатков; *б* — отделение урогастроны с полиаргининовым участком от большей части белков, присутствующих в экстракте *E. coli*; *в* — хроматографическое поведение урогастроны с присоединенным полиаргининовым «хвостом» и без него. Штриховая линия обозначает градиент соли.

следует сконструировать участок протеолитического отщепления между целевым белком и довеском. Можно также включить в состав довеска белковую последовательность, которую легко тестировать. Это может облегчить анализ продукта клонированного гена в процессе очистки, если обычный анализ затруднен.

Генно-инженерные приемы могут быть также использованы для того, чтобы свести к минимуму образования нерастворимых телец включения (см. выше). Один из путей достижения этого — создание клетки-хозяина для суперэкспрессии шаперона (например, белки DnaK, GroEL или GroES) в дополнение к интересующему белку. Другой подход предполагает внесение незначительных изменений в аминокислотную последовательность целевого белка. Например, замена одного или более остатков цистеина на серин может повысить растворимость, хотя результирующий белок не идентичен нормальной человеческой форме. Третий метод появился в результате наблюдения того, что многие белки, будучи в нативном состоянии, продуцируются в виде нерастворимых агрегатов, но могут быть получены в растворимой форме, если находятся в составе белков, слитых с такими белками как тиоредоксин, бактериоферритин или белок MalE.

ДНК для невирусной генной терапии получают исключительно в виде плазмидной ДНК (пДНК) в *E. coli*. Характерным для этой системы продукции является загрязнение пДНК хромосомной ДНК, а также РНК при очистке и обработке нуклеазами. Чтобы свести к минимуму эти проблемы, бактериальные клетки лизируют щелочным детергентом, при этом осаждаются хромосомная ДНК и бактериальные белки. Однако по-прежнему остается необходимость в удалении РНК. Один из путей удаления — сконструировать ген бычьей панкреатической рибонуклеазы в продуцирующих клетках таким образом, чтобы фермент выводился в периплазматическое пространство. Этот фермент выдерживает процедуру щелочного лизиса, и когда клеточный экстракт нейтрализуют, он быстро расщепляет любую РНК, загрязняющую пДНК.

Качество биофармацевтических препаратов

Две ключевые характеристики качества биофармацевтических препаратов — чистота и эффективность действия. Если допустить, что все биофармацевтические препараты вводятся путем инъекций, и чаще всего, непосредственно в кровь, то потенциальные загрязнения, вызывающие наибольшее беспокойство, — это любые случайные микроорганизмы, бактериальные эндотоксины, ДНК из клеток млекопитающих, которые могут содержать онкогены, и любые клеточные вирусы. Однако следует также обращать внимание на примеси белков и вариантов целевого белка (т. е. продукты деградации или неправильно сконструированные формы). Точные требуемые стандарты качества варьируют от продукта к продукту, но общие требования указаны в табл. 6-8 и 6-9. Конечный продукт должен соответствовать этим контрольным стандартам качества, но важнее всего то, что процедура очистки должна быть **валидирована**, т. е. должно быть показано, что все загрязняющие вещества, сознательно добавленные в исходный материал, удалены полностью.

Эффективность биофармацевтических препаратов может зависеть от их первичной структуры (аминокислотной последовательности), формы и фолдинга (вторичная и третичная структуры), а также взаимодействия между самими белковыми молекулами (четвертичная структура). Эндогенные белки могут быть гетерогенными на каждом уровне. Например, природный гамма-интерферон существует в шести вариантах с различными С-концами. К тому же многие белки подвергаются посттрансляционной модификации, например гликозилированию (дополнение 6-4). Для таких белков как эритропоэтин, которые гликозилируются по нескольким местам, могут существовать десятки различных природных гликоформ. Важность гликозилирования для эффективности препарата лучше всего иллюстрируется интерфероном-бета. Природная молекула гликозилирована по единственному сайту и имеет удельную активность $3 \cdot 10^8$ ед./мг. При продукции его в *E. coli* он

Таблица 6-8 Стандарты качества для суперспиральной плазмиды, которая используется в генной терапии как ДНК-вакцина или вектор

Загрязнения (примеси)	Особенности	Метод анализа
Белки	Не детектируются	Белки определяются с использованием бицинхониновой кислоты (BCA)
РНК	Не детектируется	Электрофорез в агарозном геле
Геномная ДНК	Не детектируется < 0,01 мкг/мкг плазмидной ДНК	Электрофорез в агарозном геле Блоттинг по Саузерну
Эндотоксины	< 0,1 единиц эндотоксина/мкг плазмидной ДНК	Тест с помощью лимулус-амебоцитного лизата (ЛАЛ)
Линейная или никированная (релаксированная) плазида	< 5%	Электрофорез в агарозном геле
Сходные плазмиды	Правильная картина фрагментации Ожидаемые размер и суперспирализация Ожидаемое число трансформантов по отношению к стандарту	Расщепление эндонуклеазами рестрикции Электрофорез в агарозном геле Анализ эффективности трансформации

Таблица 6-9 Стандарты качества для терапевтических белков, получаемых с помощью технологии рекомбинантных ДНК

Стандарт	Комментарии
Чистота более 95%	Методы, используемые для определения чистоты препарата, зависят от конкретного белка, но могут включать электрофорез в полиакриламидном геле и ВЭЖХ
Микрогетерогенность ниже установленного уровня и/или допустимая картина микрогетерогенности	Используемые методы зависят от ожидаемой гетерогенности, но могут включать также ВЭЖХ и масс-спектрометрию
Примеси ДНК менее 10 пг на дозу	Для продуктов, полученных в животных клетках с помощью векторов на основе онкогенных вирусов или без них, допустимые уровни должны быть значительно ниже
Эндотоксины ниже установленного уровня	Это важно в случае продуктов, получаемых в <i>E. coli</i>
Реактивы, используемые на стадии очистки, ниже установленного уровня	Используемые методы зависят от типов загрязнений
Отсутствие микроорганизмов	Проверка стерильности на различных средах
Удельная активность выше минимального уровня и предпочтительно максимально возможная	Удельная активность должна измеряться в одной (или более) подходящих биологических системах тестирования

Дополнение 6-4 Использование лектин

карта гликозилирования

Гликопротеины — это белки, у которых углеводный компонент ковалентно присоединен к полипептидной цепи через боковые цепи аминокислотных остатков. Углеводные цепи (**гликаны**) гликопротеинов подразделяются на N- или O-гликаны, в зависимости от аминокислотных остатков, к которым они присоединены. N-Глики содержат аминокислотный остаток N-ацетилглюкозамин, присоединенный через азот боковой цепи аспарагина. O-Глики связываются через гидроксильные группы, и если они содержат N-ацетилгалактозамин, то связываются с остатками серина или треонина. Для гликопротеинов обнаружены сотни различных гликановых структур, но такое разнообразие возникает в результате комбинаций всего лишь нескольких структурных элементов (рис. Д6-4а). С биофармацевтической точки зрения гораздо важнее то, что от 1 до 10 гликановых структур могут быть связаны с конкретным гликопротеидом. Даже в одном и том же гликопротеине различные сайты гликозилирования могут нести различные типы структур. Вариативность гликановых структур, связанных с одним и тем же сайтом гликозилирования в популяции гликопротеинов, имеющих одну и ту же аминокислотную последовательность, называется **микрогетерогенностью**. Гликопротеины с одной и той же аминокислотной последовательностью, но с различными гликанами называют **гликоформами**.

Различные гликоформы одного и того же белка имеют различные фармакокинетические профили. Поэтому очень важно, чтобы при разработке технологического процесса были выбраны условия, которые способствуют получению наиболее предпочтительной гликоформы. Более того, как только начинается продукция, необходимо регулировать соотношение между различными гликоформами. Трудность достижения этих целей заключается в том, что анализ характера гликозилирования обычно крайне трудоемок и требует много времени. Некоторые биофармацевтические препараты, такие как интерферон бета, имеют одну гликановую цепь, и наблюдается лишь несколько простых гликоформ. В этом случае анализ можно провести с помощью ВЭЖХ после освобождения гликановых цепей из белка. В других случаях (как в случае эритропоэтина) имеется множество сайтов гликозилирования с присоединенными сложными гликанами, и тогда наблюдается множество различных гликоформ. Единственный путь провести анализ должным образом — использовать масс-спектрометрические методы, причем анализ одного образца может занять несколько недель. Недавно был разработан новый метод анализа гликопротеинов, основанный на лектиновых микрочипах.

Лектины — это связывающие сахара белки неиммунной природы, которые агглюти-

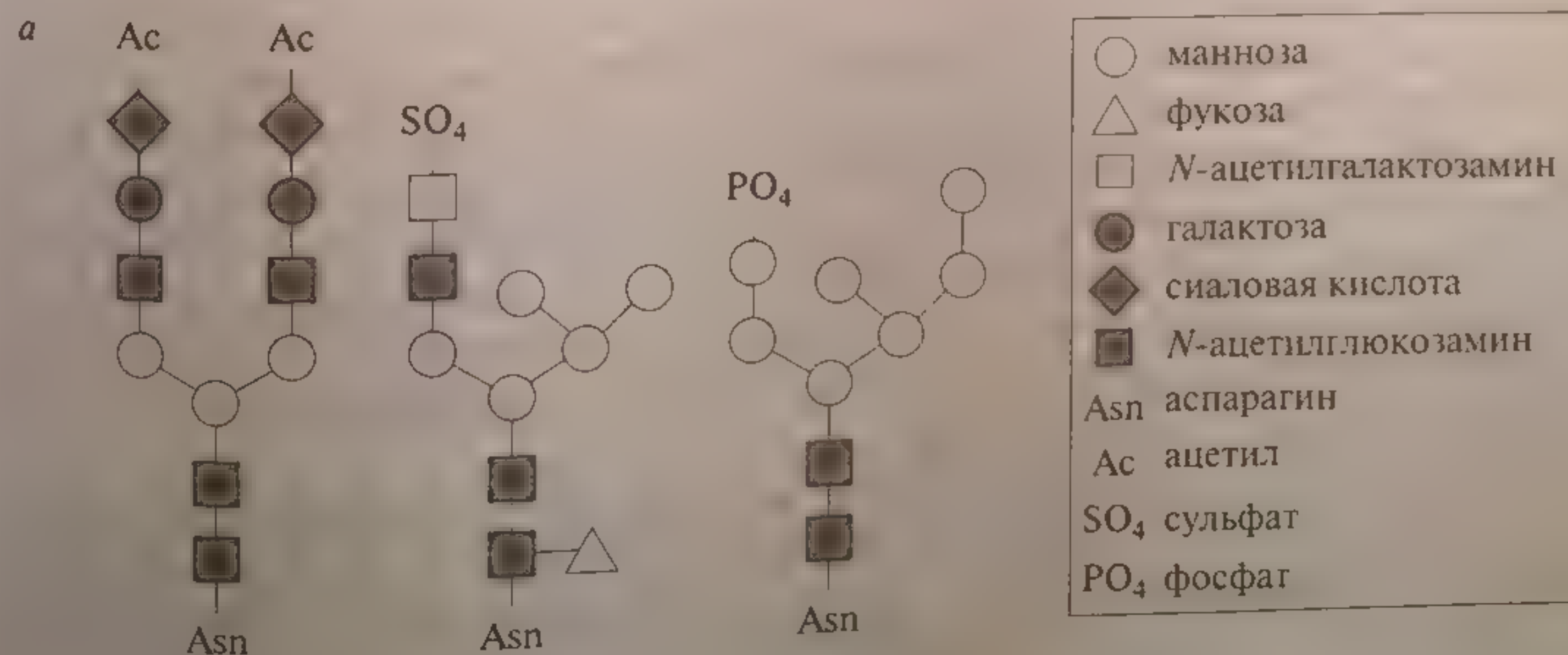


Рис. Д6-4а Примеры некоторых N-гликанов.

нируют клетки или осаждают гликопротеины. Как правило, лектины связывают олигосахариды, а не моносахара, и различные лектины обладают различной специфичностью. Установив, какие лектины связываются с биофармацевтическим препаратом, можно выяснить гликановую структуру. На практике множество различных лектинов наносят в виде точек на мембрану, получая в результате микрочип. Добавляют исследуемый белок (биопрепарат), а затем меченные различными флуорофорами лектины для получения лектиновых «сэндвичей». С помощью определенных программ анализируют картину флуоресценции (рис. Д6-4б) и устанавливают характер гликозилирования. Два идентичных образца биопрепаратов дают одинаковые картины на лектиновом «сэндвиче», что может быть полезным инструментом контроля качества.

На рис. Д6-4б показаны фингерпринты гликозилирования, полученные для двух различных образцов гликопротеинов. Анализ этих фингерпринтов показывает, что два образца неидентичны. Ключевое различие — отсутствие концевых остатков сиаловой кислоты в образце 1, так как наличие концевых остатков сиаловой кислоты может увеличивать время полужизни терапевтического белка *in vivo*. Из фингерпринта видно, что оба образца не имеют фукозы, концевых остатков GalNAc, структур с высоким содержанием маннозы. Другая информация, которую можно извлечь из фингерпринта, хотя и косвенно, это отсутствие гибридных и укороченных гликанов, низкое содержание структур с одной точкой разветвления углеводной цепи и высокое содержание структур с двумя точками разветвления.

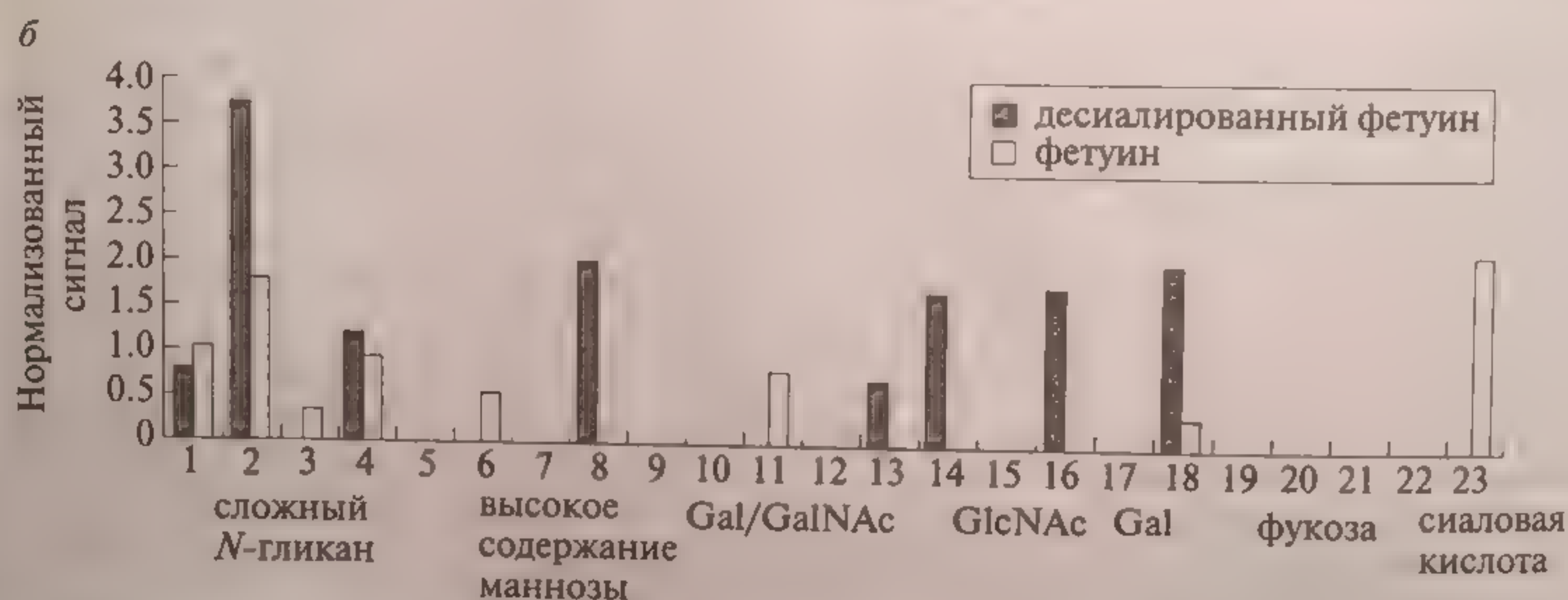


Рис. Д6-4б Гликановые фингерпринты, полученные в результате анализа двух образцов гликопротеинов на микрочипе с 23 лектинами.

негликозилирован, и удельная активность составляет только $3 \cdot 10^6$ ед./мг. Однако в результате замены остатка цистеина в положении 17 на остаток серина активность белка может быть полностью восстановлена даже в случае материала, полученного в *E. coli*. Следует отметить, что определение эффективности вакцин может быть проблематичным, когда нет подходящих животных моделей, так как ключевое свойство вакцины — ее способность вызывать соответствующий иммунный ответ у человека.

Различия в характере гликозилирования могут также влиять на фармакокинетику и иммуногенность биофармацевтического препарата. Например, удаление концевых остатков сиаловой кислоты из углеводных цепей эритропоэтина уменьшает период полужизни *in vivo* с 8 ч до 5 мин! Удаление сиаловой кислоты делает доступными остатки галактозы, и они свя-

зываются с узнающими галактозу рецепторами в печени, что приводит к быстрой потере асиало-эритропоэтина из системы кровообращения. Следует отметить, что когда клетки перестраивают для получения суперпродукта терапевтического белка, уровень экспрессии этого белка может оказаться таким, что механизм гликозилирования будет от него отставать. В таких случаях возможно получение новых гликоформ, которые организм будет воспринимать как чужие. Это в свою очередь может приводить к нежелательному иммунному ответу, и такой неблагоприятный эффект наблюдали с некоторыми коммерческими препаратами эритропоэтина.

Международный стандарт качества GMP

Качество фармацевтического продукта не может быть гарантировано только тщательным анализом небольшого числа образцов, взятых из всей партии. Проблема заключается в том, что проведенные на конечном продукте тесты контроля качества могут не выявить низкий уровень или неравномерное распределение примесей. Иллюстрацией к этой проблеме служит наблюдавшаяся в 1960-х годах серия летальных случаев в госпиталях, которая была связана с микробным заражением растворов, вводившихся внутривенно. Эти растворы были произведены коммерчески, но не были нужным образом стерилизованы, а тесты на контроль качества (QC, от англ. quality control) не позволили установить наличие остаточных загрязнений. Эти случаи привели к разработке правил организации производства и контроля качества лекарственных средств GMP, которые в настоящее время соблюдаются в фармацевтической промышленности (дополнение 6-5)¹. По существу требования GMP заключаются в том, что продукт должен производиться из исходного сырья высокого качества высококвалифицированными специалистами на совершенном оборудовании с использованием технологических процессов, позволяющих воспроизводимо получать конечный продукт высокого качества, способный пройти все QC-тесты.

Ключевая часть GMP — это валидация (validation — подтверждение), т. е. доказательство, не вызывающее сомнений, что данный процесс может постоянно и надежно выдавать материал, пригодный для заявленного использования. Поскольку биофармацевтические препараты вводятся путем инъекций, они не должны содержать микроорганизмов, прионов, нуклеиновых кислот (за исключением векторов), онкогенов и любых других веществ, используемых на стадии очистки продукта. Несомненно, что исходной точкой является использование материалов высочайшего качества и известного происхождения. Например, при использовании сыворотки зародышей телят из стада, не имеющего БГЭ, нет опасности, что продукт будет заражен БГЭ, и, следовательно, отсутствует вероятность того, что реципиент приобретет болезнь Кройцфельда—Якоба. Это иллюстрирует ключевой момент: гораздо легче использовать материал, свободный от возможных

¹ В РФ — с 2006 г., а для иммунобиологических препаратов — с 2008 г. — Прим. ред.

Дополнение 6-5. Термины, используемые для терминологии биофармацевтических препаратов

Производство

Это полный цикл получения медицинского продукта. Он включает приобретение всех исходных (сырьевых) материалов, переработку их в конечный продукт с его последующей упаковкой и распространением.

Гарантии качества

Термин подразумевает проведение суммы всех мероприятий, необходимых для подтверждения того, что конечный продукт по своему качеству соответствует заявленному предназначению. Сюда включено соответствие стандартам надлежащей производственной практики (GMP) (см. ниже), а также такие факторы, как выбор исходного продукта и схемы его переработки.

Международный стандарт качества GMP

Соблюдение международного стандарта качества GMP (надлежащей производственной практики биофармацевтических препаратов) — гарантия того, что продукт произведен в соответствии с тем стандартом качества, которое необходимо для использования данного продукта по назначению. GMP требует, чтобы процесс производства был полностью описан еще до начала производства

и были обеспечены все необходимые для него условия. На практике это означает соблюдение следующих требований

- Персонал должен быть необходимым образом обучен
- Обеспечены необходимые помещения и оборудование
- Должны быть использованы правильные исходные материалы
- Должны использоваться валидированные процедуры, и никакие изменения невозможны без письменного разрешения
- Должны быть созданы условия для хранения и транспортировки материалов.
- Необходима полная пошаговая регистрация и ведение контрольно-учетных записей.

Контроль качества

Контроль качества как составная часть GMP гарантирует, что на каждой стадии производства проводятся необходимые тесты и что продукт не попадет на рынок до тех пор, пока не пройдет эти тесты.

Контроль производственного процесса

Он включает любой анализ продукта, окружающей среды или оборудования, проводимый в процессе производства.

загрязнений, чем доказать, что технологический процесс позволит надежно избавиться от загрязнений в случае их наличия. Аналогичным образом, если уровень посторонних примесей все время поддерживается на минимальном уровне, то существует гораздо более высокая вероятность, что во время производственного процесса эти примеси будут удалены. Таким образом, если работать в соответствии с заранее предусмотренными высокими стандартами гигиены, загрязнение чужеродными микроорганизмами будет сведено к минимуму, и наибольшие риски для биофармацевтических препаратов будут связаны только с хозяином-производителем.

Для биофармацевтических препаратов, продуцируемых в бактериях и дрожжах, основными примесями, вызывающими наибольшее беспокойство, являются эндотоксины (только грамотрицательные бактерии), за-

¹ Так называемые стандартные операционные процедуры (СОП). — Прим. перев.

грязняющие (примесные) белки и структурные варианты продукта (если продукт — терапевтический белок). Разрабатываемые процессы, которые устраняют такие загрязнения, не очень сложны. В связи с этим следует заметить, что с увеличением уровня экспрессии продукта уменьшается беспокойство, связанное с примесями. Например, удаление загрязняющих белков гораздо проще в случае, если целевой белок составляет 30, а не 3% пула всего синтезируемого белка. Валидация процессов с участием культур животных клеток гораздо более затруднена, так как необходимо показать, что продукт свободен от онкогенных вирусов и онкогенов. Поскольку хозяева-производители — трансформированные клеточные линии, то необходимо убедительное доказательство того, что процесс очистки удалит эти загрязнения, если они будут присутствовать в исходном материале.

Альтернативные системы производства

Все обсуждения, представленные в этой главе, касались производства биофармацевтических препаратов путем культивирования клеток микроорганизмов или животных. Это путь получения биопрепаратов, которым мы располагаем сегодня, но он очень дорог! Поскольку цены, установленные биофармацевтическими компаниями за свою продукцию, не меняются, то нет сильного экономического давления, заставляющего менять сложившуюся систему. Тем не менее были экспериментально разработаны альтернативные системы. Одна из таких технологий, называемая «сельскохозяйственной», предполагает производство терапевтических белков в молоке сельскохозяйственных животных, в куриных яйцах и растениях. Технология производства уже достаточно далеко продвинулась, чтобы сделать предварительные оценки стоимости продуктов. Большое преимущество «сельскохозяйственного» культивирования — низкие цены (табл. 6-10). Однако имеются и недостатки. Создание трансгенных сельскохозяйственных животных, производящих требуемый белок, — не очень легкая работа, и по-прежнему, существует проблема примесей онкогенных вирусов и прионов. Получение трансгенных растений, напротив, гораздо

Таблица 6-10 Относительная стоимость различных производственных систем за вычетом капитальных затрат

Система	Стоимость (\$/г)
Клетки яичников китайского хомяка	300
Яйца кур	2
Молоко козы	2
<i>E. coli</i>	1
Трансгенные растения	0,1

проще, и нет риска передачи человеческих патогенов. Однако поля трансгенных растений привлекают внимание борцов за охрану окружающей среды, которые без каких-либо угрызений совести уничтожают урожай, и это не поддается контролю со стороны агентств, жестко контролирующих другие стороны производства. Время покажет, будут ли эти системы производства признаны в широком масштабе.

Дополнительная литература

POGM: В гл. 4 и 5 представлено подробное описание контроля копийности плазмид, создания высокоэкспрессионных векторов и использования специализированных векторов для облегчения стадии очистки. Производство белков «сельскохозяйственным» путем описано в гл. 14 с опорой на материалы, представленные в других главах.

Обзор по проблемам, не затронутым в данной главе:

Baker KN, Rendall MH, Patel A *et al.* (2002) Rapid monitoring of recombinant protein products: a comparison of current technologies. *Trends in Biotechnology* 20, 149–156.

Обзор более подробно освещает проблемы, непосредственно связанные с тематикой данной главы, а также содержит некоторые дополнительные материалы:

Borgebaeck CAK, Carlsson R (2001) Human therapeutic antibodies. *Curr Opin Pharmacol* 1, 404–408.

Обзор послужит хорошим дополнением к данной главе:

Chu L, Robinson DK (2001) Industrial choices for protein production by large scale cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 12, 180–187.

Великолепный учебник, в котором более подробно обсуждаются затронутые здесь темы, а также многие другие, вообще не рассматриваемые здесь или других главах, такие как создание формулы препарата, фармакодинамика, фармакокинетика, стерилизация и другие:

Crommelin DJA, Sindelar RD (eds) (2002) *Pharmaceutical Biotechnology*, 2nd edn.

Два великолепных взаимодополняющих обзора, которые охватывают публикации по различным методам крупномасштабной очистки плазмид:

Ferreira GNM, Monteiro GA, Prazeres DMF, Cabral JMS (2000) Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends Biotechnol* 18, 380–388.

Levy MS, O'Kennedy RD, Ayazi-Shamlou P, Dunnill P (2000) Biochemical engineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA. *Trends Biotechnol* 18, 296–305.

Обзор включает описание ряда успешных случаев продукции антител в растениях:

Fischer R, Twyman RM, Schillberg S (2003) Production of antibodies in plants and their use for global health. *Vaccine* 21, 820–825.

Великолепный обзор редко обсуждаемой в литературе проблемы фолдинга белка при крупномасштабном производстве:

Middleberg APJ (2002) Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* 20, 437–443.

Геномика и создание новых лекарственных препаратов

Введение. Как разрабатывают лекарства?

До появления современной фармацевтической промышленности поиск терапевтических средств осуществлялся совсем по-иному: проводились наблюдения за действием экстрактов растений при их внутреннем употреблении, например так вошел в фармацевтическую практику аспирин (противовоспалительное средство) и хинин (противомалярийное средство). В настоящее время риск причинить человеку вред, прописывая ему вещества с неизвестными фармакологическими эффектами, совершенно не приемлем, и разработка новых лекарств идет по стандартному и хорошо проверенному пути (рис. 7-1). При выявлении нового лекарства важное значение отведено обязательным двум составляющим: тест-системе или набору тест-систем и химическим реагентам. Тесты — это обычно биохимические исследования белка (или **мишени**), который участвует в развитии той или иной болезни. Задача поиска лекарства состоит в том, чтобы найти химическое вещество, которое подавляет активность мишени (**антагонист**) или увеличивает его активность (**агонист**).

Как только идентифицировано одно или более химических веществ, взаимодействующих необходимым образом с мишенью («хит», наиболее удачные), они подвергаются серии последовательных химических модификаций (**оптимизация**) с целью идентификации усовершенствованных молекул (**лидирующих, превосходящих по своим свойствам**) с оптимальными биохимическими свойствами *in vitro* и высокой эффективностью *in vivo*. Затем следует этап доклинических испытаний. На этой стадии под лидирующей молекулой подразумевается та, которая обладает наибольшей стабильностью и способна достигать ткани-мишени в организме подопытного животного или человека. Адсорбция, распределение, метаболизм и экскреция (АРМЭ, фармакокинетика) лекарства определяются после введения его в подопытное животное; при этом выясняется также его токсичность. Проверка токсичности осуществляется несколькими способами. Тесты на высокую токсичность осуществляются на животных путем последовательного увеличения доз вводимого вещества до тех пор, пока не будут достигнуты конечная точка (смерть) или достаточно высокая пороговая концентрация. Тесты на хроническую токсичность вклю-

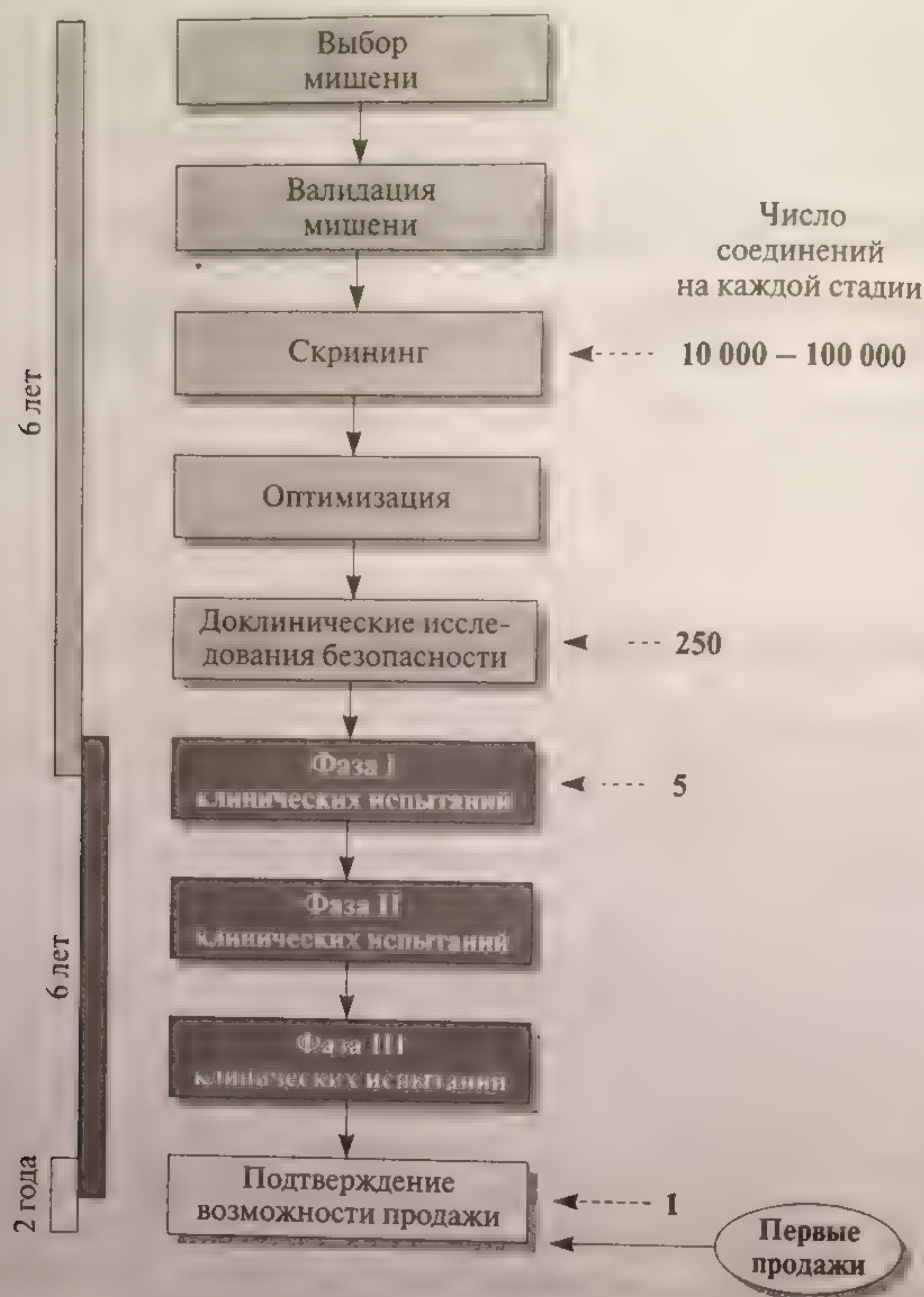


Рис. 7-1 Процесс выявления нового лекарства.

чают повторное введение исследуемого вещества и разработаны таким образом, чтобы выявлять эффекты, связанные с длительным употреблением лекарства. Если предполагается, что лекарство будет употребляться в течение длительного времени, то анализ на хроническую токсичность включает также тест на канцерогенность. Проводится исследование токсического действия вещества на репродуктивную функцию для обеспечения гарантий, что плоду не будет нанесен ущерб в случае приема лекарства беременной женщиной.

Если лидирующее вещество удовлетворяет всем указанным тестам, оно проходит клинические испытания. Клинические испытания включают четыре хорошо охарактеризованные фазы. В фазе I лекарство-кандидат прописывается здоровым людям-добровольцам. Фаза I имеет две цели: установить безопасность возрастающих доз и получить базовую фармакокинетическую информацию. Цель фазы II клинических испытаний — определить, является ли лекарство перспективным в одном или более кли-

нических показаниях; при этом небольшая группа больных впервые подвергается действию лекарства. Испытания планируются таким образом, чтобы определить наиболее подходящую схему приема лекарства и оценить клинический эффект относительно к концентрации лекарства и его метаболитов. В фазе III испытаний участвуют гораздо большее число больных, но эти испытания начинаются только при наличии доказательств, что:

- препарат обладает достаточной степенью эффективности;
- уровень риска возникновения неблагоприятных реакций (с учетом показанной эффективности лекарства) вполне приемлем.

Фаза III испытаний преследует две цели. Во-первых, получают данные об эффективности и безопасности, которые будут удовлетворять требованиям, выдвигаемым распорядительными органами при выдаче разрешения на выпуск лекарства на рынок. Во-вторых получают информацию, которая позволит практикующим врачам эффективно применять лекарство. Фаза IV испытаний наступает после того, как лекарство поступает на рынок, и ее цель — установить эффективность препарата при длительном применении с участием гораздо большего числа больных.

Преобразование «хита» (перспективного соединения) в лидирующее соединение происходит при тесном сотрудничестве химиков и биологов. Молекулы, взаимодействующие с мишенью, модифицируются различным образом и снова подвергаются тестированию. С учетом полученных результатов предпринимаются попытки установить соотношение между структурой и активностью (SAR, от *англ.* structure—activity relationships) и проводятся новые циклы модификации молекулы до тех пор, пока у биологов не появится уверенность, что соединение обладает оптимальными свойствами и может быть выбрано в качестве лидирующего. Химик-органик в среднем за год может получить около 50–100 соединений, в зависимости от сложности используемых химических реакций; об этом должно знать руководство компании, чтобы принимать решение, сколько химиков необходимо задействовать для осуществления того или иного проекта. Разумное время для получения лидирующего соединения с использованием описанного выше подхода составляет 1–2 года. Лимитирующим фактором обычно является стадия первоначального синтеза и изучение многочисленных параметров в рамках программы SAR (установления связи между структурой и функцией).

Около 15 лет назад были обнаружены новые подходы к проведению ранних стадий поиска лекарств. Таким нововведениям способствовали две разработки. Первая из них — создание высокопроизводительных, поддающихся автоматизации методов анализа, которые могут проводиться ежедневно тысячами и десятками тысяч. Вторая — разработка методов одновременного синтеза большого числа химических соединений, которые могут быть использованы для высокопроизводительного скрининга. Тогда возникла проблема отсутствия достаточного числа новых подходящих мишеней. С появлением геномики идентификация потенциальных новых мишеней перестала быть скоростью-лимитирующей стадией (см. гл. 3 и 4). Теперь основная проблема заключается в том, чтобы подтвердить возможность использования конкретных мишеней для клинических целей.

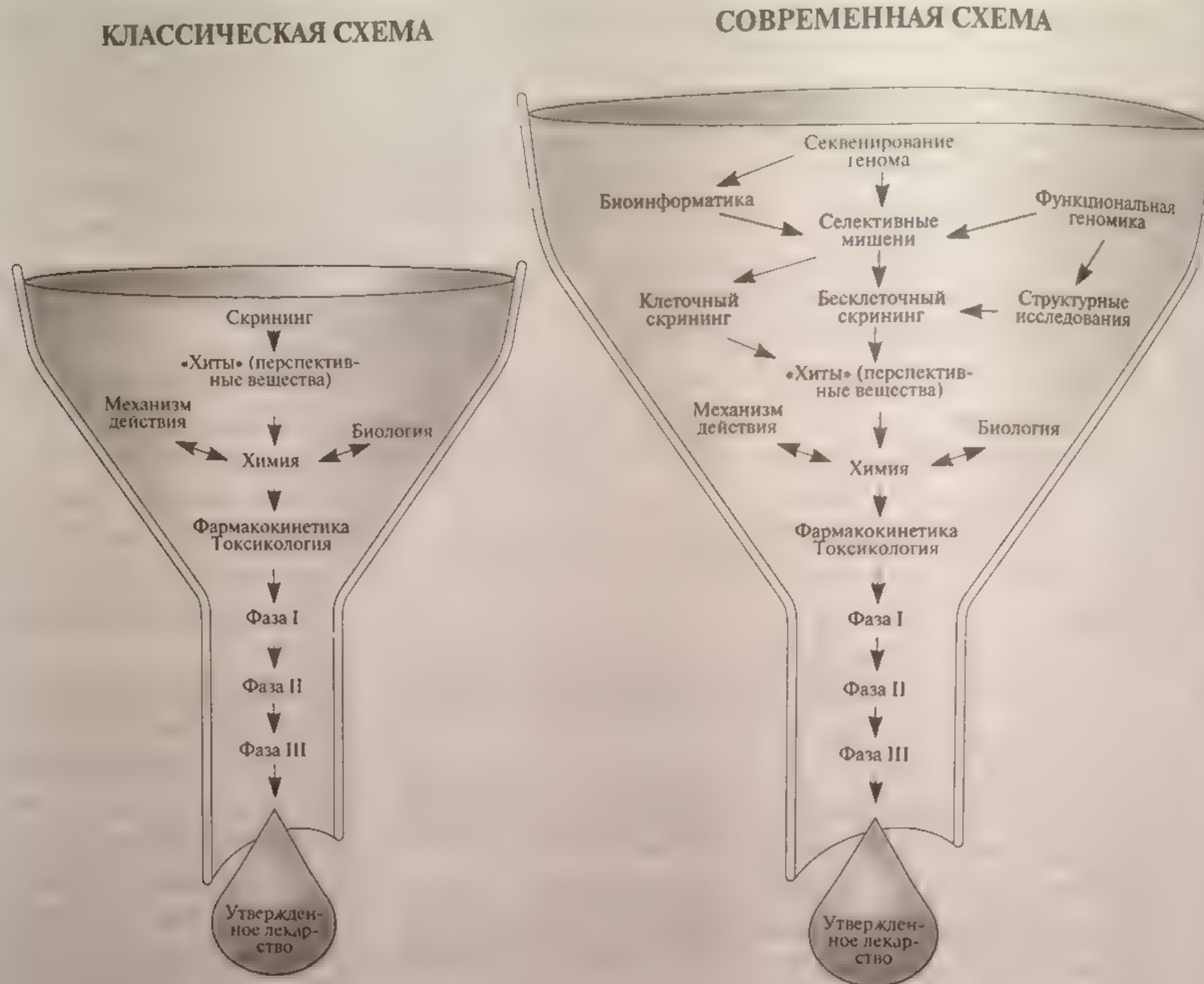


Рис. 7-2 Классическая и современная схемы разработки лекарств.

Полный процесс создания нового лекарственного препарата можно для наглядности изобразить с помощью фильтровальной воронки, вставленной в сосуд (рис. 7-2). Идентификация лидирующего соединения находится в конусе, а доклинический анализ и клинические испытания находятся в трубке. С появлением высокопроизводительного скрининга, новых подходов к химическому синтезу и новых методов идентификации мишени конус «воронки» увеличился, а трубка стала шире горлышка сосуда. Если более 90% стоимости разработки нового препарата приходится на поздние стадии, то будет экономически выгоднее проводить какой-то вариант предварительного скрининга, чтобы устранить те лекарства, которые могут не пройти тест на безопасность и клинические испытания. К счастью, геномика начинает делать свой вклад в эту область.

Высокоэффективный скрининг

Чтобы химическое вещество было активно в качестве фармацевтического препарата, оно должно селективно связываться с одним или несколькими клеточными белками, т. е. с мишенью. Следовательно, анализ *in vitro*

может быть попросту сведен к установлению способности исследуемых лигандов связываться с белком-мишенью. Если белок-мишень обладает ферментативной активностью, то наилучший тест — ингибирование этой активности. Если необходимо проводить большое число анализов, например тысячи в день, то идеальным является такой тест на связывание, который не требует отделения свободного лиганда от связанного. Такой анализ называют гомогенным. Было разработано несколько вариантов гомогенного анализа, но только два из них будут описаны здесь: метод оптических биосенсоров и сцинтилляционный анализ близкого расстояния (SPA).

В первом случае молекула-мишень связывается с поверхностью биосенсорного чипа, а затем добавляется анализируемый лиганд. Любое имеющее место связывание можно контролировать в режиме реального времени с использованием оптической детекции, известной как поверхностный плазмонный резонанс (SPR). Сигнал SPR отражает изменения концентрации вещества у поверхности детектора, когда молекулы связываются или диссоциируют от сенсорного чипа. Материал биочипов позволяет иммобилизовать широкий набор молекул-мишеней, включая ДНК, ферменты, антитела и рецепторы, а также более сложные молекулы, такие как липосомы и тромбоциты.

В методе SPA молекула-мишень связывается с флуоресцирующими микросферами (гранулами), которые действуют как сцинтилляторы; т. е. эти гранулы испускают свет, когда радиоактивное вещество приближается к молекуле-мишени (рис. 7-3). Для осуществления высокопроизводитель-

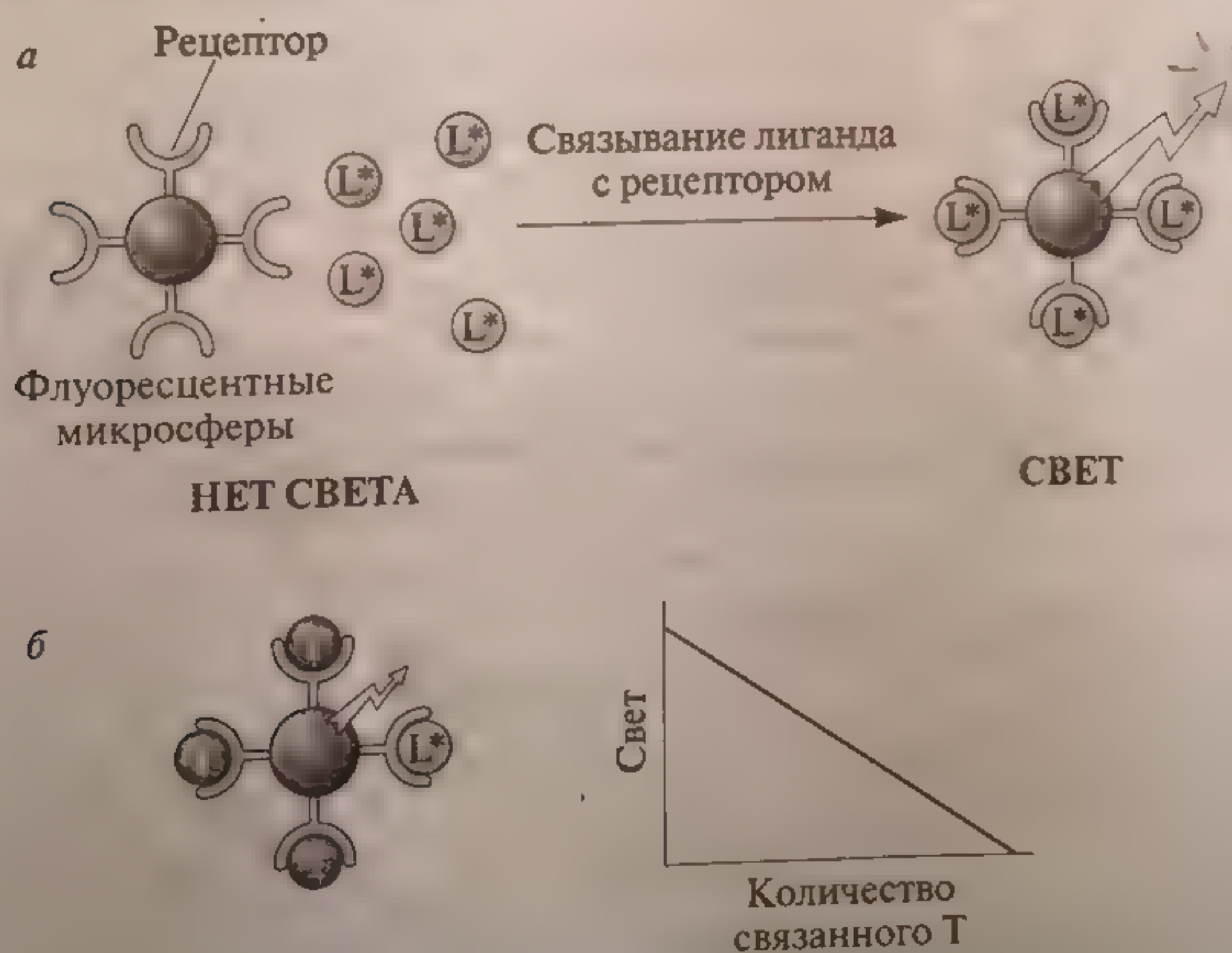
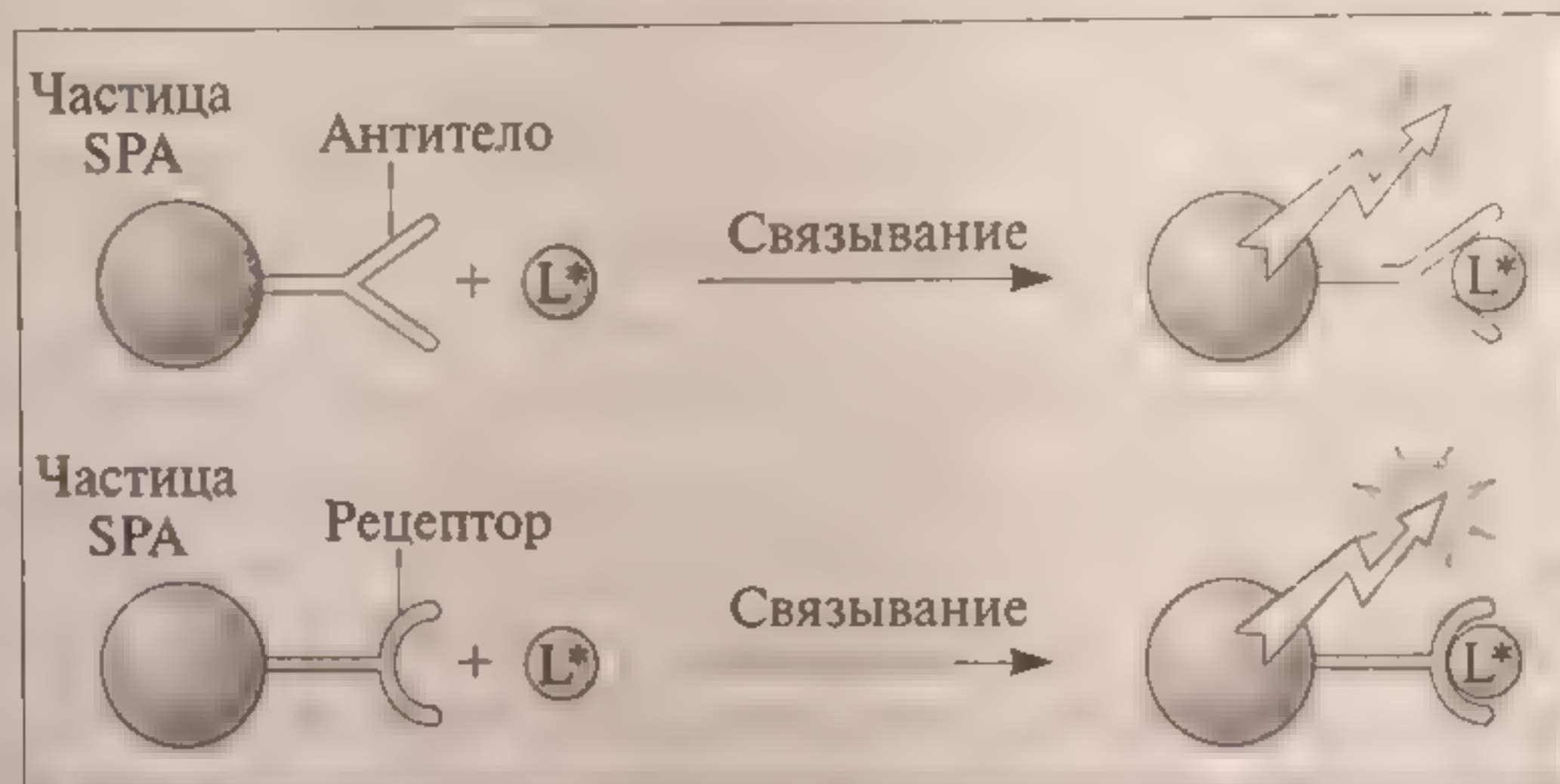


Рис. 7-3 Принцип сцинтилляционного анализа близкого расстояния. а — связывание радиоактивного лиганда (L^*) с иммобилизованным рецептором приводит к эмиссии света. б — немеченое тестируемое вещество (T) также способно к связыванию с иммобилизованным рецептором и, следовательно, конкурирует с L^* . На графике показано, что чем выше концентрация T , тем меньше связанного с рецептором L^* и тем ниже эмиссия света.

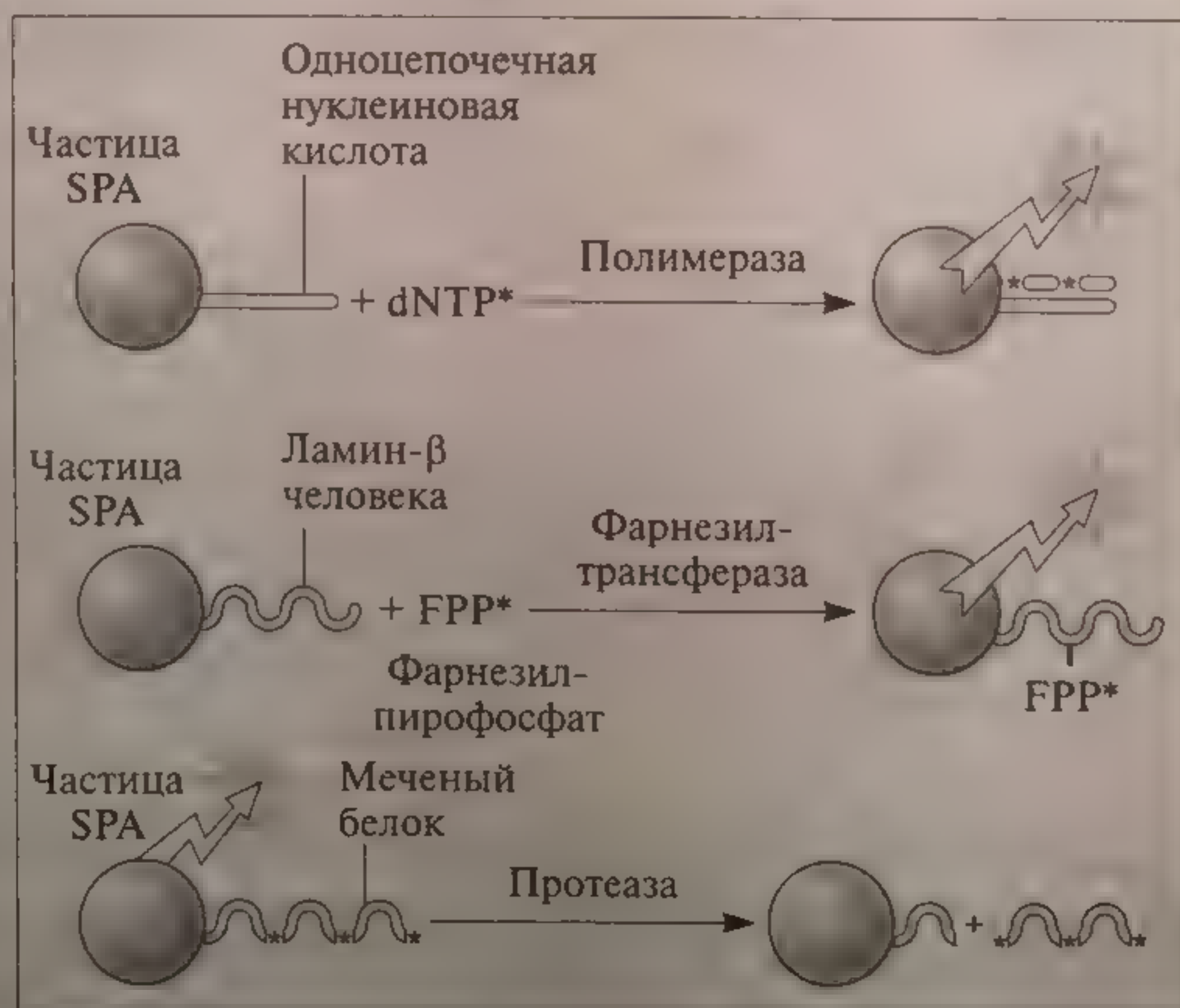
ного анализа необходимо провести связывание с радиоактивно-меченным лигандом, который взаимодействует с молекулой-мишенью. Затем добавляются тестируемые лиганды, и те из них, которые уменьшают выход света

Дополнение 7-1 Сцинтилляционный анализ близкого расстояния

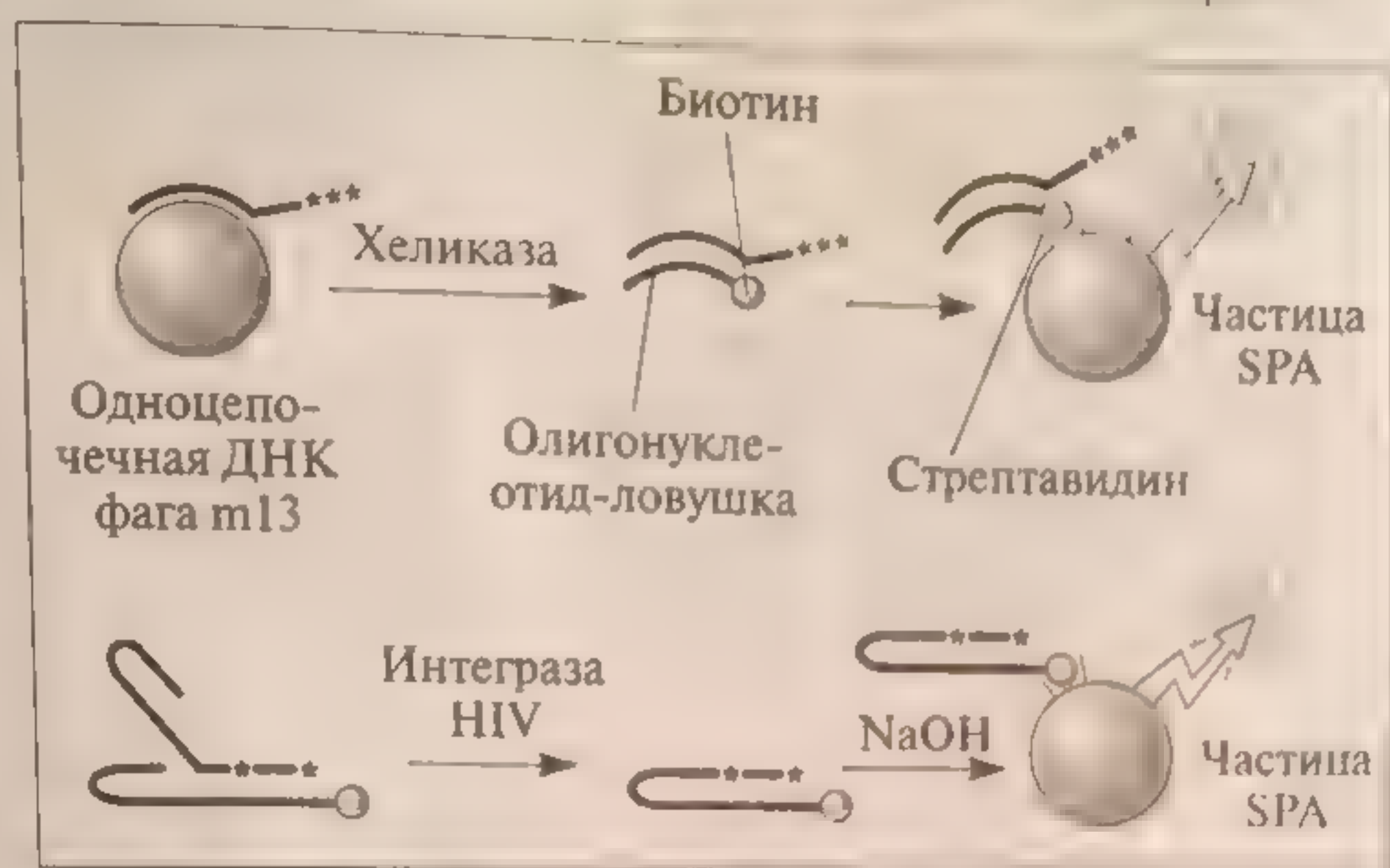
(1) Сцинтилляционный анализ близкого расстояния универсален и может быть использован для высокопроизводительного анализа связывания лигандов и изучения большого разнообразия ферментативных реакций. Широкое применение нашли два типа исследования связывания лигандов: связывание с антителами и связывание с рецепторами, и оба они могут проводиться методом сцинтилляционного анализа близкого расстояния.



(2) Методы анализа ферментативной активности, которые были адаптированы к использованию в формате SPA, включают ДНК- и РНК-полимеразы (например, ревертаза), протеазы (например, протеаза ВИЧ) и трансферазы (например, фарнезилтрансфераза). Как и в случае анализа связывания лигандов, действие полимеразы или трансферазы приводит к увеличению эмиссии света. Напротив, при изучении протеазы исходные реагенты испускают свет, и активность фермента приводит к снижению светового выхода.



(3) Другие ферменты, которые можно анализировать методом SPA, включая ферменты, процессирующие нуклеиновые кислоты, такие как хеликаза и интеграза.



со сцинтилляционных гранул, конкурируют за связывание с молекулой-мишенью. Красота метода SPA состоит в том, что он может быть легко адаптирован к анализу различных объектов, включая анализ ферментов (дополнение 7-1).

Описанные выше простые виды анализа связывания лигандов имеют ряд проблем. Например, при изучении связывания лигандов с очищенными белками вспомогательные факторы, существенные для фармакологического ответа, могут отсутствовать или присутствовать в других соотношениях. Кроме того, эти методы применимы для выявления соединений, которые связываются с теми же сайтами на мишени, что и меченый лиганд, и, чаще всего, с той же конформационной формой рецептора. Таких ограничений можно избежать при использовании функционального анализа на основе клеток (рис. 7-4). В этом случае нет отбора лигандов по способности связываться со специфическими сайтами или по механизму взаимодействия. Напротив, этот вид анализа позволяет идентифицировать новые соединения, присоединяющиеся к различным сайтам и имеющие другие механизмы взаимодействия.

Несмотря на то что функциональные клеточные тесты имеют ряд преимуществ по сравнению с лиганд-связывающими тестами, последние отличаются простотой проведения, причем в высокопроизводительном варианте. В частности, аналитическая матрица может быть приспособлена для работы с большим набором геномных мишеней. Были описаны варианты для таких разных мишеней, как ядерные рецепторы, взаимодействующие с G-белками рецепторы, ионные каналы и протеинкиназы (табл. 7-1).

Другое применение клеточного скрининга — поиск новых антибиотиков. Все используемые в клинической практике антибиотики изначально были идентифицированы как антибактериальные агенты. Такой широкий скрининг на основе клеток не позволяет идентифицировать биохимическую мишень для потенциального лидирующего соединения и не дает

Таблица 7-1 Сравнение клеточных uHTS-систем

Метод анализа	Классы мишеней	Клеточный ответ	Метод измерения	Специальные компоненты для анализа	Время детекции сигнала	Преимущества	Недостатки
R-SAT	GPCR, ядерные рецепторы, киназы и цитокиновые рецепторы	Выбор рецептора и амплификация, а также клеточная пролиферация	Широкий набор маркерных генов	Способы детекции репортерных генов	Дни	Простой протокол, возможности uHTS, работа с большим набором мишеней, мультиплексинг мишеней	Ответ удален от стадии модуляции рецептора
Технология меланофоров	GPCR и цитокиновые рецепторы	Распределение пигмента	Пропускание света	Культированные меланофоры, специальные условия	Секунды — минуты	Быстрый ответ, возможность мультиплексинга мишеней	Фон клеток немлекопитающих
FLIPR	GPCR и ионные каналы	Возникновение мембранной разности потенциалов	Интенсивность флуоресценции	Интегрированное считывающее устройство для планшет и чашек и флуоресцентные образцы	Секунды — минуты	Быстрый проксимальный эффект	Внесение красящего вещества мгновенный ответ может ограничивать производительность
FRET-основанные сенсоры напряжения	Ионные каналы	Быстрая перезарядка на мембране	Флуоресценция — FRET	Скоростное считывающее устройство для измерения напряжения	Миллисекунды — секунды	Возможность измерять быстрые изменения мембранного потенциала	Фоновый сигнал необходимость использования запатентованного оборудования

Экворин	GPCR	Кальций	Люминесценция	Козлентеразин	Секунды	Выбор внутриклеточных мишеней (субклеточных)	Сверхбыстрая люминесценция медленная регенерация образца
Репортеры транскрипции	GPCR, ядерные рецепторы, цитокиновые рецепторы и др.	Регуляция транскрипции	Широкий набор маркерных генов	Способы детекции репортеров	Часы — дни	Энзиматическая амплификация, разнообразие входящих сигналов	Продолжительность инкубации не прямой ответ
cAMP-иммуноанализ	GPCR	cAMP	cAMP-иммунотестирование	cAMP-антитело	Секунды — минуты	Проксимальное измерение вторичного мессенджера	Сложный протокол
FRET-основанные генетические сенсоры	Протеазы и GPCR	Кальций и расщепление белка	Флуоресценция — FRET	Генетические конструкции с GFP-сенсором	Секунды — минуты	Неинвазивный, позволяет выявлять субклеточные мишени и проводить логометрические измерения (мутности)	Нет ферментативной амплификации сигнала

Сокращения: GFP — зеленый флуоресцентный белок, GPCR — рецепторы, связывающие G белки; FLIPR — флуориметрическое считывающее устройство для чашек, FRET — флуоресцентный резонансный перенос энергии, R-SAT — метод рецепторной селекции и амплификации, uHTS — ультравысокопроизводительный скрининг (ультравысокоэффективный).

Таблица 7-1 Сравнение клеточных uHTS-систем

Метод анализа	Классы мишеней	Клеточный ответ	Метод измерения	Специальные компоненты для анализа	Время детекции сигнала	Преимущества	Недостатки
R-SAT	GPCR, ядерные рецепторы, киназы и цитокиновые рецепторы	Выбор рецептора и амплификация, а также клеточная пролиферация	Широкий набор маркерных генов	Способы детекции репортерных генов	Дни	Простой протокол, возможности uHTS, работа с большим набором мишеней, мультиплексинг мишеней	Ответ удален от стадии модуляции рецептора
Технология меланофоров	GPCR и цитокиновые рецепторы	Распределение пигмента	Пропускание света	Культивированные меланофоры, специальные условия	Секунды — минуты	Быстрый ответ, возможность мультиплексинга мишеней	Фон клеток немлекопитающих
FLIPR	GPCR и ионные каналы	Возникновение мембранной разности потенциалов	Интенсивность флуоресценции	Интегрированное считывающее устройство для планшет и чашек и флуоресцентные образцы	Секунды — минуты	Быстрый проксимальный эффект	Внесение красящего вещества мгновенный ответ может ограничивать производительность
FRET-основанные сенсоры напряжения	Ионные каналы	Быстрая перезарядка на мембране	Флуоресценция — FRET	Скоростное считывающее устройство для измерения напряжения	Миллисекунды — секунды	Возможность измерять быстрые изменения мембранного потенциала	Фоновый сигнал необходимость использования запатентованного оборудования

Экворин	GPCR	Кальций	Люминесценция	Коэленτεραзин	Секунды	Выбор внутриклеточных мишеней (субклеточных)	Сверхбыстрая люминесценция медленная регенерация образца
Репортеры транскрипции	GPCR, ядерные рецепторы, цитокиновые рецепторы и др.	Регуляция транскрипции	Широкий набор маркерных генов	Способы детекции репортеров	Часы — дни	Энзиматическая амплификация, разнообразие входящих сигналов	Продолжительность инкубации не прямой ответ
cAMP-иммуноанализ	GPCR	cAMP	cAMP-иммунодетекция	cAMP-антитело	Секунды — минуты	Проксимальное измерение вторичного мессенджера	Сложный протокол
FRET-основанные генетические сенсоры	Протеазы и GPCR	Кальций и расщепление белка	Флуоресценция — FRET	Генетические конструкции с GFP-сенсором	Секунды — минуты	Неинвазивный, позволяет выявлять субклеточные мишени и проводить логометрические измерения (мутности)	Нет ферментативной амплификации сигнала

Сокращения: GFP — зеленый флуоресцентный белок; GPCR — рецепторы, связывающие G-белки; FLIPR — флуорометрическое считывающее устройство для чашек; FRET — флуоресцентный резонансный перенос энергии; R-SAT — метод рецепторной селекции и амплификации; uHTS — ультравысокопроизводительный скрининг (ультравысокоэффективный).

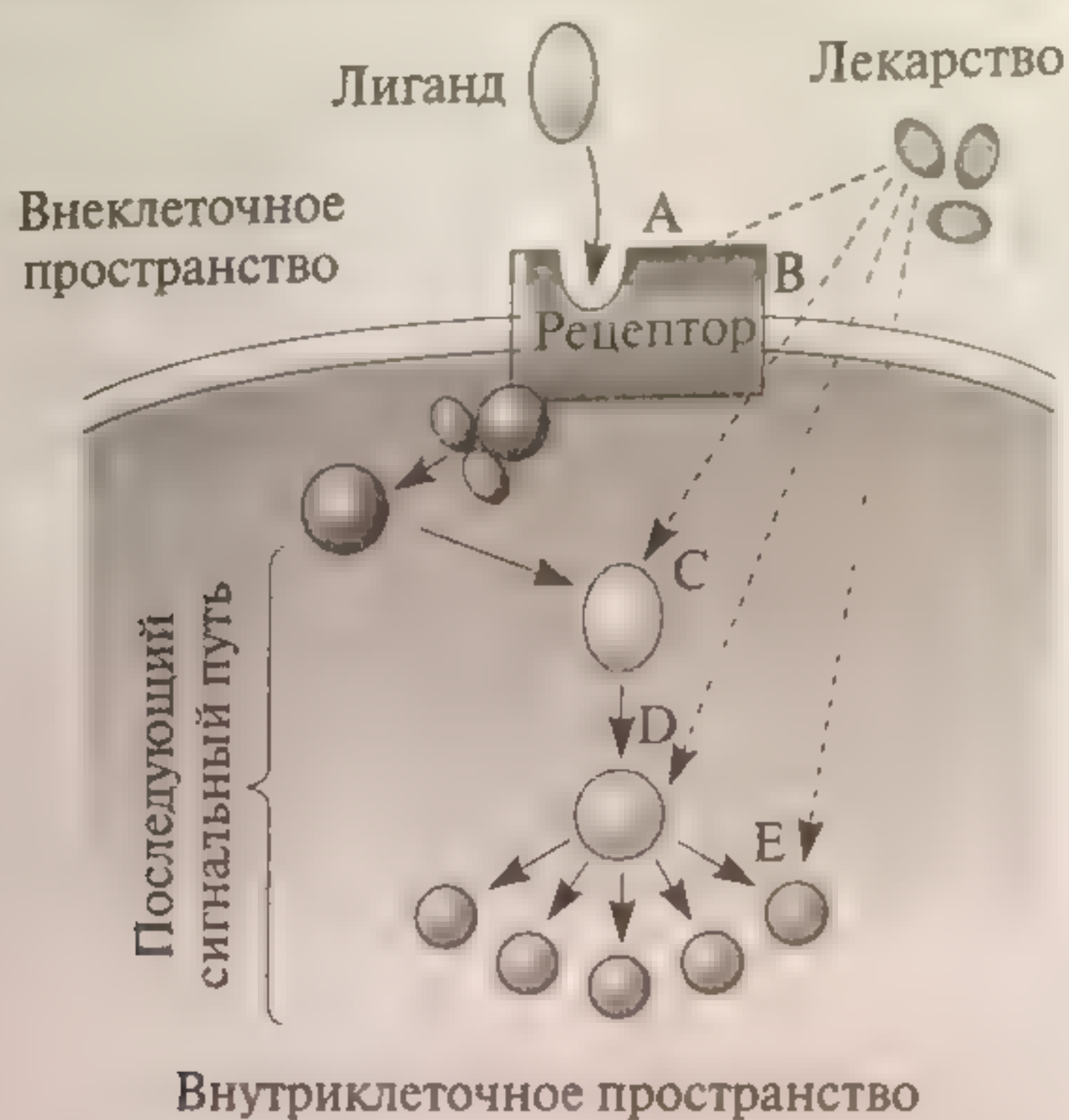


Рис. 7-4 Функциональный клеточный анализ позволяет сканировать множество потенциальных мест взаимодействия лекарства. Представлен путь передачи сигнала, ведущий от лиганд-рецепторного взаимодействия к последующим событиям. Потенциальные места действия лекарства обозначены буквами А–Е: А — место взаимодействия лекарства там, где взаимодействует и лиганд. Место может быть обнаружено при анализе связывания лиганда. В — множественные альтернативные сайты, с которыми может взаимодействовать лекарство и тем самым менять функцию мишени, не конкурируя со специфическим лигандом за место его связывания. С–Е–Д другие факторы в каскаде передачи сигнала, с которыми лекарство может взаимодействовать, изменяя последующий ответ на модуляцию рецептора. Функциональный клеточный анализ может давать ответ в случае действия лекарства на позиции А–Е, а анализ связывания лиганда ограничивается обнаружением взаимодействия с местом А.

возможности оптимизировать соединение на основе структурно-функциональных соотношений. В связи с этим фармацевтическая индустрия изменила принцип поиска антимикробных препаратов: вместо ингибирования клеточного роста исследовалось ингибирование специфических биохимических мишеней. Хотя с использованием этого нового подхода были идентифицированы многие мощные ингибиторы ферментов, ни один из них не обладал антибиотическими свойствами. Поэтому наметилось движение обратно к анализу на основе клеток, но уже с использованием специфических мишеней.

Исходным пунктом для новых методов поиска антибактериальных агентов является создание штаммов, более чувствительных к специфическим ингибиторам ферментов, чем к антибактериальной активности как таковой. Это достигается путем клонирования в плазмиде существующих для жизнедеятельности клетки генов (табл. 7-2) под контролем хорошо регулируемых промоторов. Соответствующий хромосомный ген затем удаляется путем рекомбинации при трансформации линейной ДНК. В результате получают клетки, у которых внутриклеточный уровень одного существенного белка-мишени может регулироваться специфическим индуктором. Концентрация белка-мишени в клетке меня-

Таблица 7-2 Гены-мишени для клеточного скрининга антибиотиков

Ген	Продукт гена	Функция гена
<i>dnaB</i>	Хеликаза	Репликация ДНК
<i>fabI</i>	Еноил-АСР-редуктаза	Биосинтез жирных кислот
<i>folA</i>	Дигидрофолат-редуктаза	Промежуточный метаболизм
<i>gyrB</i>	Субъединица В ДНК-гиразы	Репликация ДНК
<i>metG</i>	Метионил-тРНК-синтетаза	Синтез белка
<i>murA</i>	UDP-ацетил-D-глюкозамин Енолпирувил-трансфераза	Биосинтез клеточной стенки
<i>pyrH</i>	UMP-киназа	Промежуточный метаболизм
<i>tufA</i>	Фактор элонгации Tu	Синтез белка

ется, и затем проводится скрининг штамма с использованием химической библиотеки, где конечной точкой служит ингибирование роста клеток. У таких методов анализа существует несколько преимуществ. Во-первых, данный подход применим к любой мишени, включая белки, которые трудно исследовать *in vitro*. Во-вторых, идентифицированные в результате скрининга вещества гарантированно обладают антибактериальной активностью. В-третьих, скрининг для различных мишеней проводится одним и тем же способом и при одних и тех же условиях, что облегчает проведение массового анализа.

Подтверждение действенности препарата и животные модели

До появления геномики для каждого типа болезни известно было лишь ограниченное число мишеней, и идентификация новой мишени фармацевтической компанией давала ей конкурентное преимущество. Сегодня с использованием методов, описанных в гл. 3 и 4, число возможных мишеней существенно превышает возможности фармацевтической промышленности проводить тотальный скрининг. Прежде чем появится возможность расширить ограниченные ресурсы, «плохие» мишени должны быть отброшены путем жесткого биологического отбора. Должны рассматриваться только те мишени, которые обладают специфическими биологическими свойствами, пригодными для терапевтического воздействия, иначе плохо охарактеризованные мишени могут «засорить трубопровод» поиска лекарств.

Используют множество методов валидации лекарственных мишеней. Эти методы включают: биоинформатическую категоризацию генов, анализ уровней экспрессии генов в здоровых и больных тканях (рис. 7-5),

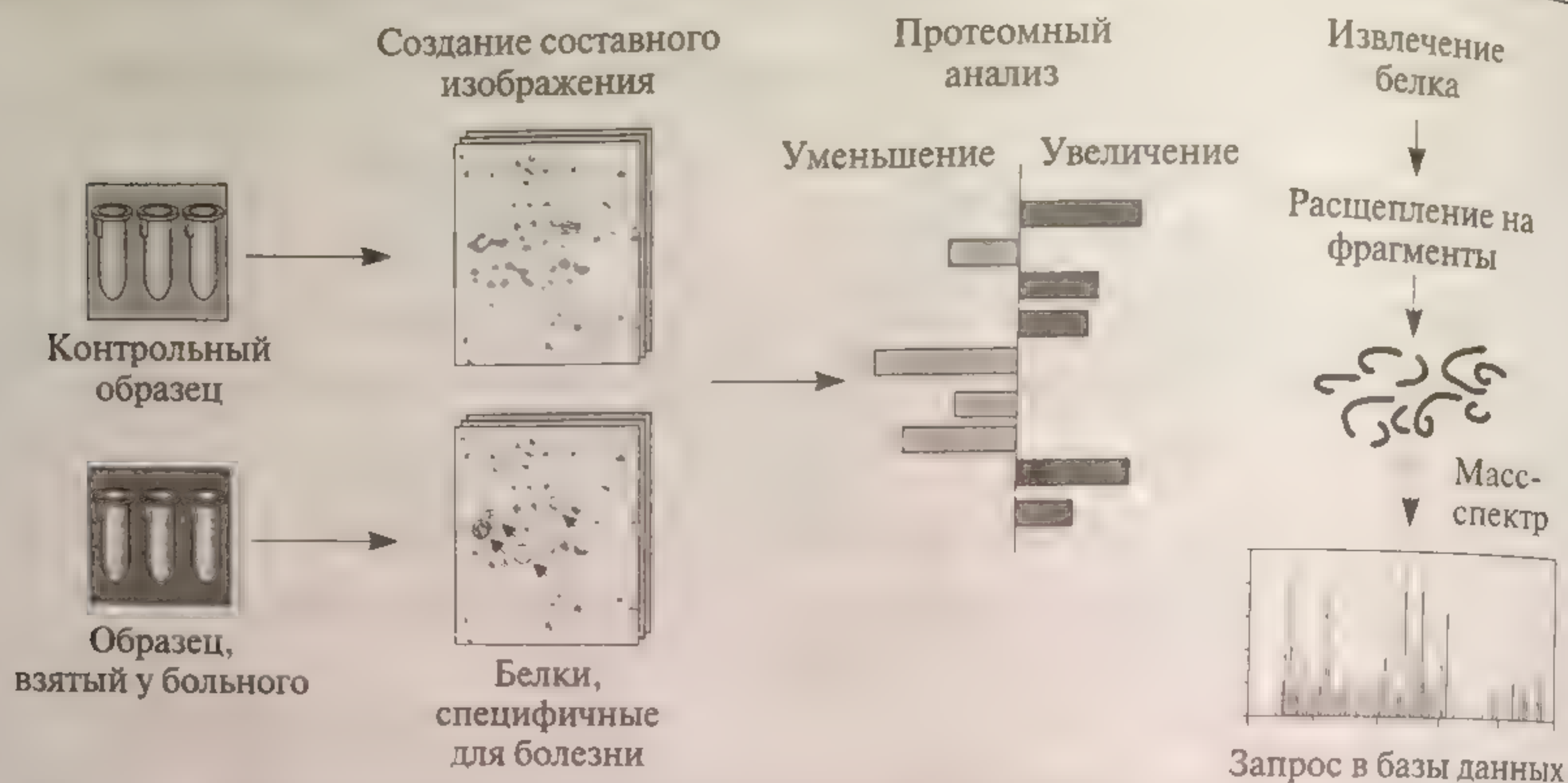


Рис. 7-5 Схема различных этапов протеомного анализа. Образцы белков из групп больных и здоровых (контроли) людей разделяют двумерным электрофорезом в гелях. Получают множество изображений, и результирующую информацию собирают в протеомные базы данных. Стрелками показаны белки, которые каким-либо образом изменены в образцах, взятых у больных. Белковые профили можно сравнивать с помощью специальных компьютерных программ. Диаграмма показывает уменьшение или увеличение количества белков на гелях. Интересующие белки идентифицируют путем извлечения их из геля, последующего расщепления протеазами и МС-анализа.

клеточные тесты, подтверждение *in vivo* на животных моделях и окончательное подтверждение путем проверки новых химических соединений в клинических испытаниях на человеческом организме. Значимость данных, полученных этими разнообразными методами, для процесса выявления лекарств широко варьирует. Метод, дающий чрезвычайно важную информацию, основан на использовании мышинных моделей человеческой болезни. Эти модели позволяют не только выбрать наиболее значимую мишень, но и выявлять лекарства-кандидаты. Вообще, такие мышинные модели создают путем введения мутаций в интересующие исследователя гены (их называют **нокаутными мышами**). Возможные генетические изменения включают делеции, нарушающие функцию гена, условные аллели, которые обеспечивают тканеспецифичный или временный контроль генной экспрессии, и точечные мутации. Методы создания таких мутантных мышей будут описаны позже (см. с. 247). Здесь достаточно сказать, что несмотря на длительность процесса, он успешно внедряется в производство.

Доказательством применимости нокаутных мышинных моделей является сходство между фенотипом мышей, лишенных белков-мишеней специфических лекарств, и клиническим фенотипом человека, вызванным приемом соответствующего лекарства-антагониста. Например, мыши, не имеющие ангиотензин-превращающего фермента (АПФ, или *англ.* ACE) или циклооксигеназы-1 (ЦОГ-1, или *англ.*

Дополнение 7-2. Прием пищи и ожирение у мышей с дефектом катепсина К

Катепсин К — специфичная для остеокластов протеаза, расщепляющая белки костной ткани, такие как коллаген типа I и II, остеоонектин и остеокальцин. Принимая во внимание эти ферментативные активности, можно предположить, что катепсин К может играть важную роль в разрушении кости и что ингибитор этого фермента может быть полезен при лечении остеопороза. У нокаутных мышей с дефектом в гене катепсина К рассасывание костей снижено, что подтверждает роль протеазы в разрушении костной ткани и возможность ее использования в качестве лекарственной мишени при лечении остеопороза.

Мыши с разрушенными генами рецепторов меланокортина-3 и -4 страдают

ожирением и гиперинсулинемией. По-видимому, эти рецепторы играют важную роль в энергетическом гомеостазе, и их активация может открыть путь к лечению ожирения. Подтверждением тому служит наблюдение, что меланотан II, агонист меланокортинового рецептора, увеличивает скорость метаболизма и подавляет аппетит у мышей дикого типа, но не у нокаутных мышей. Альтернативный путь лечения ожирения можно предложить на основании фенотипа мышей с выключенным геном ацетил-СоА-карбоксилазы 2. Эти мутантные мыши едят больше еды, чем их однопометные родственники дикого типа, но сжигают больше и запасают меньше жира в адипоцитах.

COX1), обладают фенотипом, напоминающим тот, что возникает у человека при действии ингибиторов АПФ (гипотензивные лекарства) и нестероидных противовоспалительных препаратов. Примеры лекарственных мишеней, которые активно используются в фармацевтической промышленности и которые были подтверждены с использованием мышинных моделей еще на начальной стадии разработки лекарств, — катепсин К, рецепторы меланокортина-3 и -4 и ацетил-СоА-карбоксилаза 2 (дополнение 7-2).

Как отмечено выше, животные модели можно использовать для тестирования эффективности новых лекарств-кандидатов, а также для валидации мишеней. Одно из интересных применений животных моделей — поиск подходящей лекарственной терапии для лечения генетических заболеваний, вызываемых присоединением тринуклеотидных фрагментов (см. с. 123), для которых в настоящее время не существует способов лечения. Классический пример — болезнь Хантингтона (БХ). Это аутосомно-доминантное нейродегенеративное нарушение, вызываемое присоединением CAG-повторов к гену *HD*. Удлиняющиеся повторы транслируются в аномально длинные полиглютаминовые блоки, прилегающие к N-концу продукта гена *HD* (хантингтин). Исследования, проведенные на мышинных моделях и на людях, дают основания предполагать, что мутация сопровождается потерей функции. В настоящее время существует широкий набор мышинных моделей для БХ, и они являются мощным инструментом доклинического исследования терапевтических подходов. Кроме того, болезнью Хантингтона болеют взрослые люди, так что соединения можно тестировать с целью установления их эффективности для

ее предотвращения и лечения. К настоящему времени многообещающие результаты были получены с моноциклином — антибиотиком, ингибирующим транскрипцию каспаз и синтазы оксида азота.

Комбинаторная химия

Обычно лидирующие соединения для лекарственной индустрии идентифицировали путем рационального дизайна и/или массового скрининга. В результате внедрения высокопроизводительного скрининга стало возможным анализировать сотни тысяч индивидуальных веществ в год, направленных против большого числа мишеней. Новым ограничением стало снабжение большим количеством библиотек химических веществ. До недавнего времени для массового скрининга использовались ранее полученные коллекции синтезированных веществ, находящиеся в распоряжении фармацевтических компаний, или коллекции природных продуктов. Все они имеют ограничения. Ранее полученные коллекции содержат ограниченное число различных структур (т. е. тысячи стероидов, бета-лактамов и др.) и, если они и оказываются полезными, то области применения их крайне ограничены. Природные продукты имеют ограничения, связанные со сложностью структуры выявленных лидирующих веществ и невозможностью их преобразования в более простые фармацевтические агенты. Такие ограничения были преодолены в результате использования комбинаторной химии и комбинаторного биосинтеза (см. с. 218).

В традиционной медицинской химии каждое лекарство-кандидат синтезировали индивидуально, что было крайне трудоемким и длительным процессом. В комбинаторной химии большое число веществ (называемых библиотекой) синтезируется путем проведения реакций таким образом, что одновременно получают различные комбинации продуктов. Эти библиотеки часто представляют собой смеси. Данный подход был назван **иррациональным дизайном лекарств**, так как он включает получение огромного числа всех возможных химических комбинаций на основе нескольких реагентов. Родственный этому метод — множественный параллельный синтез, при котором одинаковые реакции ведутся отдельно для получения множества индивидуальных, но родственных продуктов. т. е. библиотека соединений конструируется путем параллельного синтеза множества соединений, каждое в отдельном реакционном сосуде.

Комбинаторная химия лучше всего иллюстрируется химическим синтезом пептидов. В случае классического метода Меррифилда аминокислота присоединяется к твердофазному носителю таким образом, что аминогруппа остается свободной. Эта иммобилизованная аминокислота реагирует с N-защищенной аминокислотой, давая дипептид. После удаления защитной группы дипептид может реагировать с другой N-защищенной аминокислотой, давая трипептид. Этот цикл может

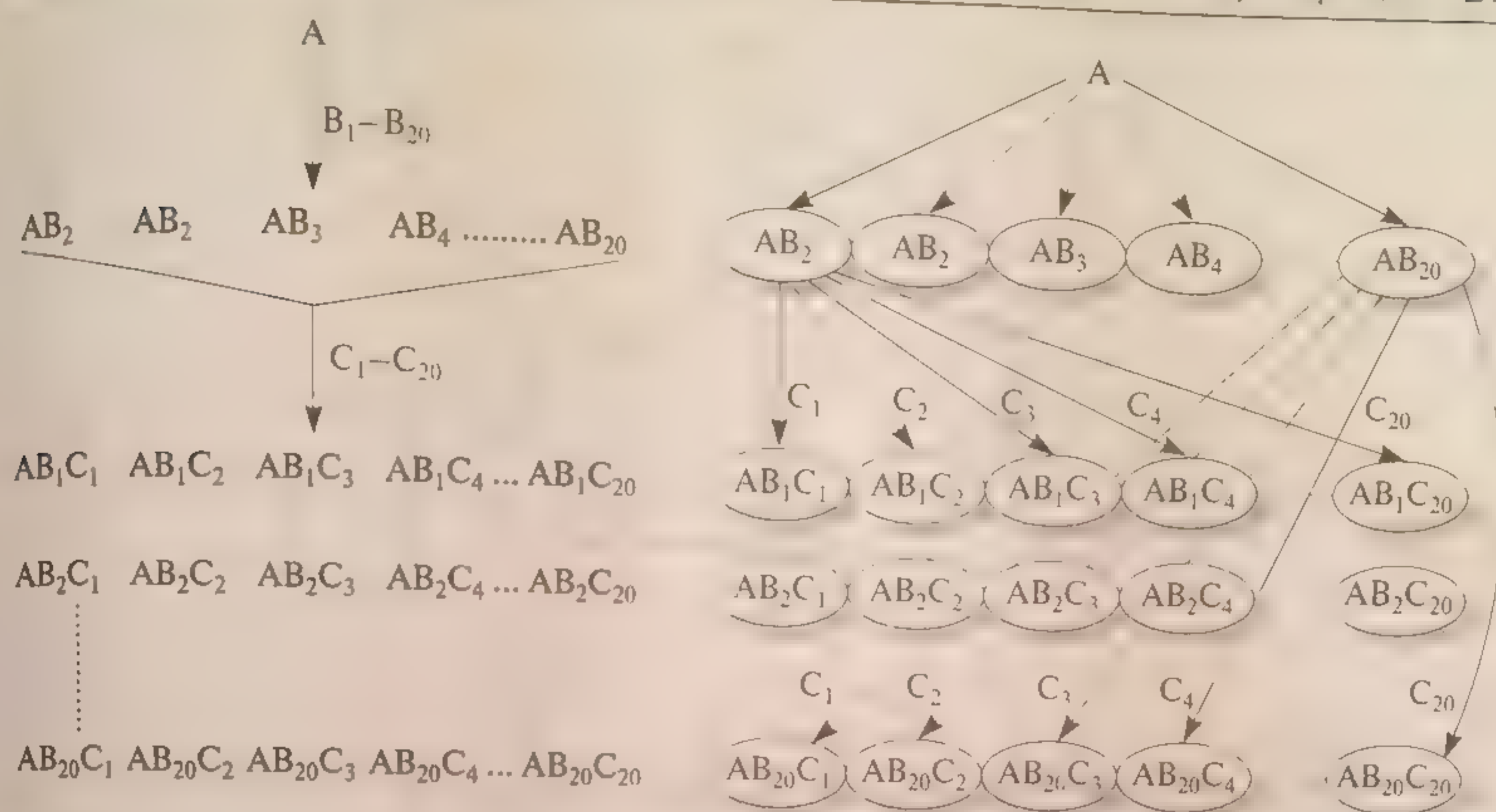


Рис. 7-6 Два различных пути синтеза пептидов со случайными последовательностями. Для простоты процесс показан только до стадии получения трипептидов.

повторяться много раз. Если на каждой стадии добавлять вместо одной N-защищенной аминокислоты 20 различных аминокислот, то будут получаться 20 дипептидов, 400 трипептидов, 8000 тетрапептидов и т. д. (рис. 7-6). Эти пептиды могут синтезироваться в смеси или индивидуально. Как следует из рисунка, если все пептиды синтезируются в смеси, идентификация всех компонентов будет затруднена. С другой стороны, если пептиды синтезировать отдельно, число отдельных реакций быстро возрастет (например, 8 тыс. тетрапептидов будет превращено в 160 тыс. пентапептидов). Другая проблема состоит в том, что на каждом цикле разные реагенты могут присоединяться с различными скоростями и с различными выходами, что может привести к большому разбросу в количественном содержании конечных продуктов. Эти проблемы можно преодолеть при использовании метода **дивергентного синтеза** (рис. 7-7).

Важный компонент метода дивергентного синтеза — возможность деконволюции (упрощения) полученной библиотеки. Пример упрощения показан на рис. 7-8 для молекулы с четырьмя разными типами заместителей (A–D). Если для каждого заместителя имеется 5 различных вариантов, то полная библиотека будет состоять из $5^4 = 625$ соединений. На первой стадии деконволюции синтезируется 25 «подбиблиотек», каждая из которых содержит 25 соединений, где заместители типа A и B определены. Такие подбиблиотеки тестируются в селективирующих системах скрининга и определяется наиболее активная подбиблиотека (A²B¹ на рис. 7-8). С учетом этих данных получают еще 5 подбиблиотек типа A²B¹CⁿD¹⁻⁵, каждая содержит пять компонентов, в которых C не определен. Оптимальный остаток D определяется на последней стадии в результате синтеза пяти

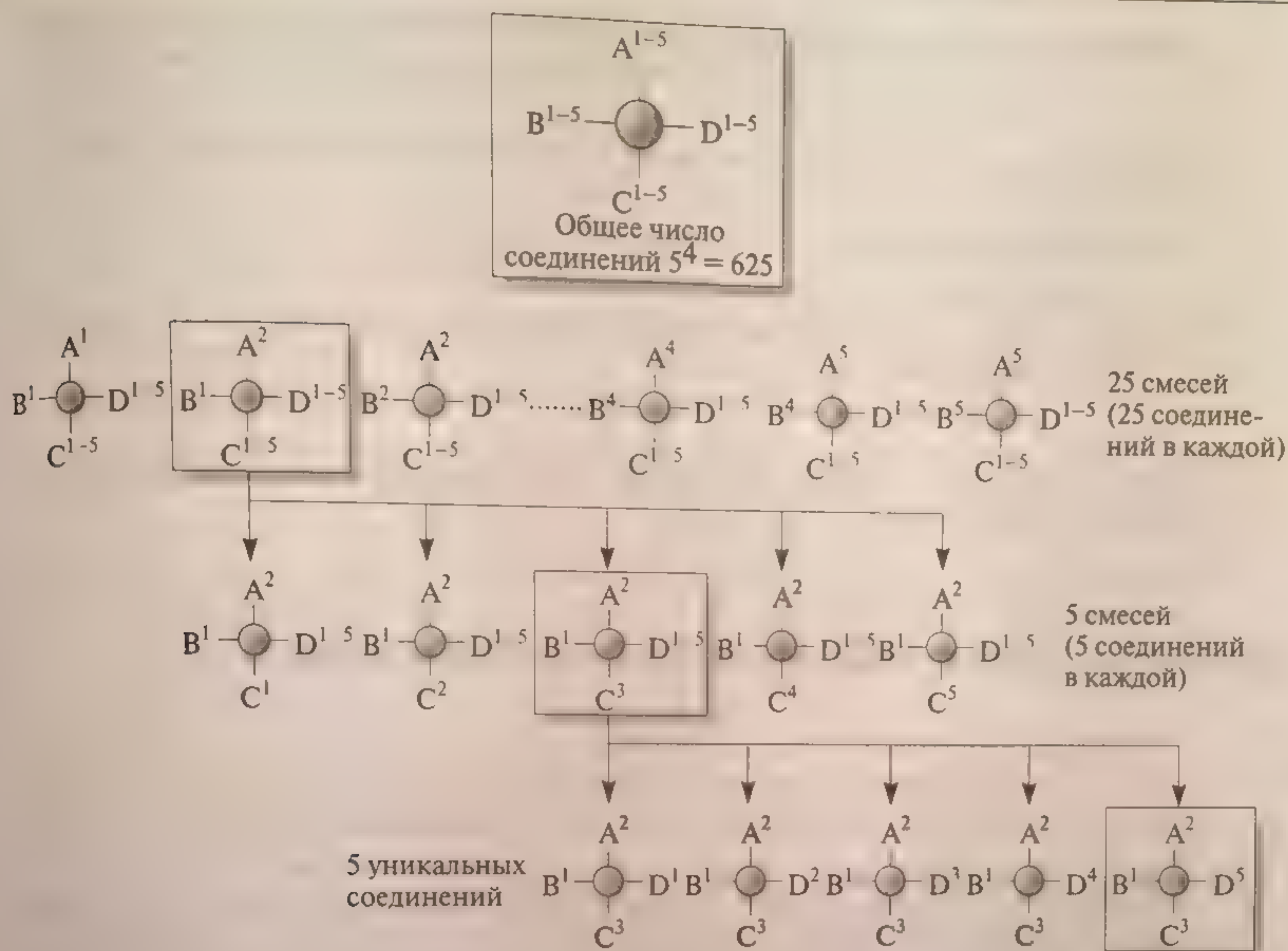


Рис. 7-8 Идентификация наиболее активного компонента библиотеки методом деконволюции.

Первый успешный пример реализации этого подхода — создание библиотеки замещенных бензодиазепинов, и с тех пор описано уже множество других.

Теоретически любая химическая матрица (структура) может выступать в роли исходного материала и любая возможная функциональная группа может быть присоединена по каждому положению матрицы. На практике медицинские химики предпочитают выбирать матрицы и функциональные группы на основании уже имеющихся данных о биологически активных соединениях. В основе выбора исходного соединения и составляющих блоков для создания потенциально активных соединений лежит анализ структуры известных лекарств. С помощью комбинаторного синтеза делаются попытки смоделировать или усовершенствовать лекарства. Существуют две причины приверженности такому более консервативному подходу. Первая из них — «правило пяти» Липински (табл. 7-3). Анализ существующих лекарств показал, что менее 80% попадают в разряд неприемлемых по каждому из критериев. Вторая причина в том, что большинство из лекарств образуется на основе всего лишь 30 (базовых) геометрических структур (если использовать атомы как вершины, а связи как ребра). Такие структуры являются

Таблица 7-3 Структурные характеристики лекарств-кандидатов, которые могут приводить к плохой адсорбции и проницаемости

- Существует более пяти доноров водородной связи (представленных суммой всех $-OH$ и $-NH$)
- Молекулярная масса > 500
- Значение логарифма коэффициента распределения ($\lg P$) > 5
- Имеется более 10 акцепторов водородных связей (представленных суммой атомов азота и кислорода)

либо очевидной отправной точкой, либо потенциальной задачей комбинаторного синтеза.

Динамические комбинаторные библиотеки

Комбинаторные методы позволяют синтезировать за короткое время огромное множество соединений, но каждое индивидуальное соединение затем необходимо охарактеризовать. Если вещество-мишень само могло быть использовано для селекции активной молекулы непосредственно из библиотеки, то процесс скрининга был бы более эффективен и существенно упрощен. Вдобавок, если бы состав библиотеки самостоятельно мог бы меняться в процессе подстраивания кандидата под структуру мишени в сторону обогащения нужными соединениями, то это существенно упростило бы идентификацию и характеристику последних. Кроме того, если активные вещества можно было бы анализировать непосредственно на стадии связывания с рецептором, то это позволило бы избежать нескольких стадий синтеза. Такой подход называется **динамической комбинаторной химией**.

Для эффективного создания динамической комбинаторной библиотеки (ДКБ) строительные блоки должны соответствовать нескольким важным характеристикам. Во-первых, они должны обладать функциональными группами, допускающими обратимую замену. Во-вторых, они должны полностью покрывать все геометрическое и функциональное пространство потенциальной мишени. В-третьих, эти узнающие группы должны быть расположены в пространстве таким образом, чтобы связывание с мишенью было оптимальным. Теоретически создание библиотеки может осуществляться с использованием любых типов обратимых физических или химических процессов при условии, что соответствующие взаимопревращения можно необходимым образом контролировать, а конечные продукты легко идентифицировать. На практике очень важно, чтобы реакционные механизмы были совместимы с биологическими мишенями, поскольку именно добавление мишени способствует формированию компонента, демонстрирующего наилучшее связывание.

Были разработаны три подхода к созданию ДКБ и скринингу. Все они имеют общую первую обратимую стадию синтеза, но различаются стадиями скрининга и селекции. При адаптивном подходе создание ДКБ осуществляется в присутствии мишени, что приводит к повышенному содержанию (амплификации) веществ с наилучшим связыванием; т. е. скрининг происходит одновременно с созданием библиотеки. В случае подхода с предварительным уравниванием создание библиотеки достигается в условиях обратимости, но идентификация и скрининг осуществляются в статических условиях. Никакой амплификации в этом случае не наблюдается, но метод очень полезен, когда биологическая мишень очень чувствительна или недоступна в больших количествах. При итеративном подходе ДКБ создают в необходимых условиях в отдельном сосуде, а затем вводят в реакцию с мишенью. Невязавшиеся вещества возвращают в реакционный сосуд, перемешивают (для установления равновесия) и снова вводят в реакцию с мишенью. После нескольких раундов синтеза и скрининга накопившиеся активные вещества можно анализировать.

Виртуальный скрининг

При виртуальном скрининге, или скрининге *in silico*, исходной точкой является трехмерная структура молекулы-мишени. Выявление потенциальных мест связывания лиганда в этой структуре осуществляется путем моделирования с использованием специальных компьютерных программ. Затем проводится анализ большого числа молекул с целью выявления тех, которые по своим геометрическим и электронным свойствам соответствуют указанным местам связывания. Молекулярными структурами, выбранными для скрининга, могут быть существующие коллекции веществ или (умозрительные) виртуальные коллекции молекулярных структур, полученные из предпочтительных наборов комбинаторных библиотек. Преимущество виртуального набора в том, что нет необходимости синтезировать структуры до проведения (умозрительного) стыковочного эксперимента *in silico*.

Наличие трехмерной структуры мишени — важное условие виртуального скрининга. Для создания таких структур используют два метода: рентгеновская кристаллография и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Первый метод чрезвычайно универсален: он применим для множества способных к кристаллизации глобулярных макромолекул, независимо от размеров и сложности самих макромолекул или их комплексов. ЯМР имеет то преимущество, что позволяет использовать концентрированные растворы, а не кристаллы. Сравнительные исследования, проведенные с использованием этих двух методов, позволяют идентифицировать места, в которых из-за контактов между кристаллами наблюдается нарушение локальной структуры. Хотя ЯМР позволяет ус- танавливать определенные динамические свойства макромолекул, его

применимость ограничена молекулами с молекулярной массой менее 30 кДа. По этой причине рентгеновская кристаллография — наиболее широко используемый метод структурных исследований. До недавнего времени наибольшее ограничение рентгеновской кристаллографии было связано с трудностью получения кристаллов высокого качества. В настоящее время многие этапы автоматизированы, и в результате в банке данных белков (Protein Data Bank) находятся структуры более 5000 различных природных белков.

Комбинаторный биосинтез и химический биосинтез

Огромное число используемых в настоящее время лекарств получено из растений и микроорганизмов. Большинство этих природных продуктов отличаются сложными структурами (рис. 7-9) со множеством хиральных центров, и селективная химическая модификация с целью получения новых молекул чрезвычайно затруднена. Это вызывает сожаление, так как такие соединения обладают множеством свойств, которые делают их хорошими лекарствами-кандидатами. Однако в настоящее время, когда биосинтез таких молекул изучен на уровне генов, были разработаны общие методы синтеза новых производных. Принцип комбинаторного синтеза показан на рис. 7-10. Наилучший пример комбинаторного синтеза — разработка новых поликетидов.

Поликетиды обладают лишь незначительным структурным сходством (рис. 7-9). Свое название они получили за наличие общих биосинтетических путей, когда при синтезе интермедиатов образуется общая для всех кетонная структура. Все поликетиды построены из линейных полимеров, содержащих атомы углерода и получаемых в результате последовательных реакций, катализируемых ферментативными комплексами, называемыми поликетидсинтазами (ПКС). Требуется от 5 до 50 ПКС-реакций, в зависимости от сложности конечной молекулы, и процесс аналогичен синтезу жирных кислот. Как только синтез линейной цепи завершен, цепь освобождается из ПКС-комплекса. Она затем циклизуется другими ферментами (не ПКС) и подвергается дальнейшей модификации, такой как метилирование, гидроксилирование, присоединение сахаров и т. д.

Поликетидсинтаза состоит не из одной белковой молекулы, а из нескольких полипептидов, обладающих, как минимум, следующими активностями: связывание, удлинение цепи и освобождение цепи. Между катализируемым ПКС удлинением и освобождением цепи зачастую вклиниваются одна или более реакций кетонной модификации. Удлиняющие и модифицирующие полипептиды вместе называются модулями; ПКС может содержать один или несколько модулей. Поскольку гены всех модулей сцеплены, их очень легко изолировать и клонировать в новых хозяевах, таких как *E. coli* и дрожжи. Как только генные кластеры были

Рис.

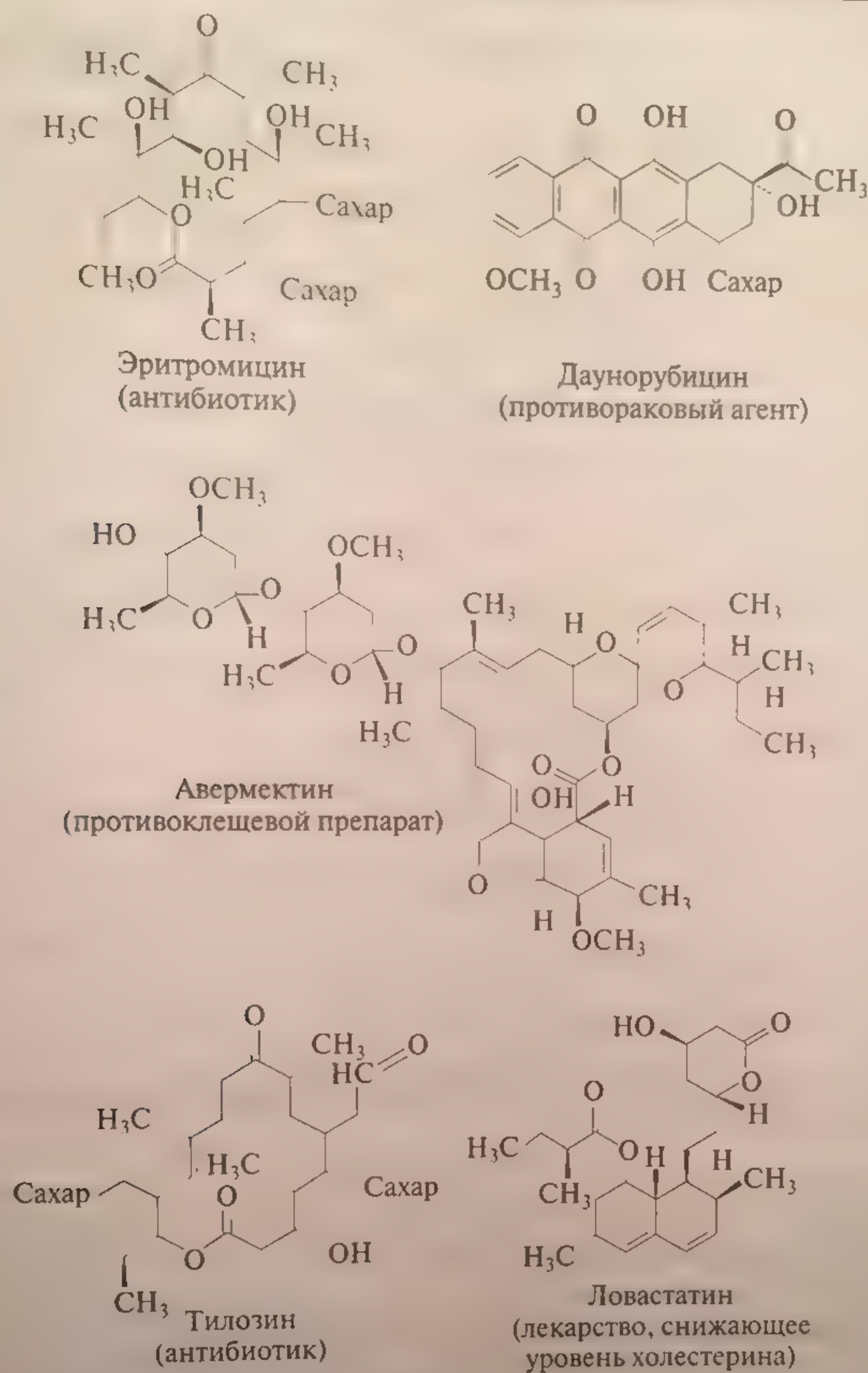


Рис. 7-9 Примеры поликетидов.

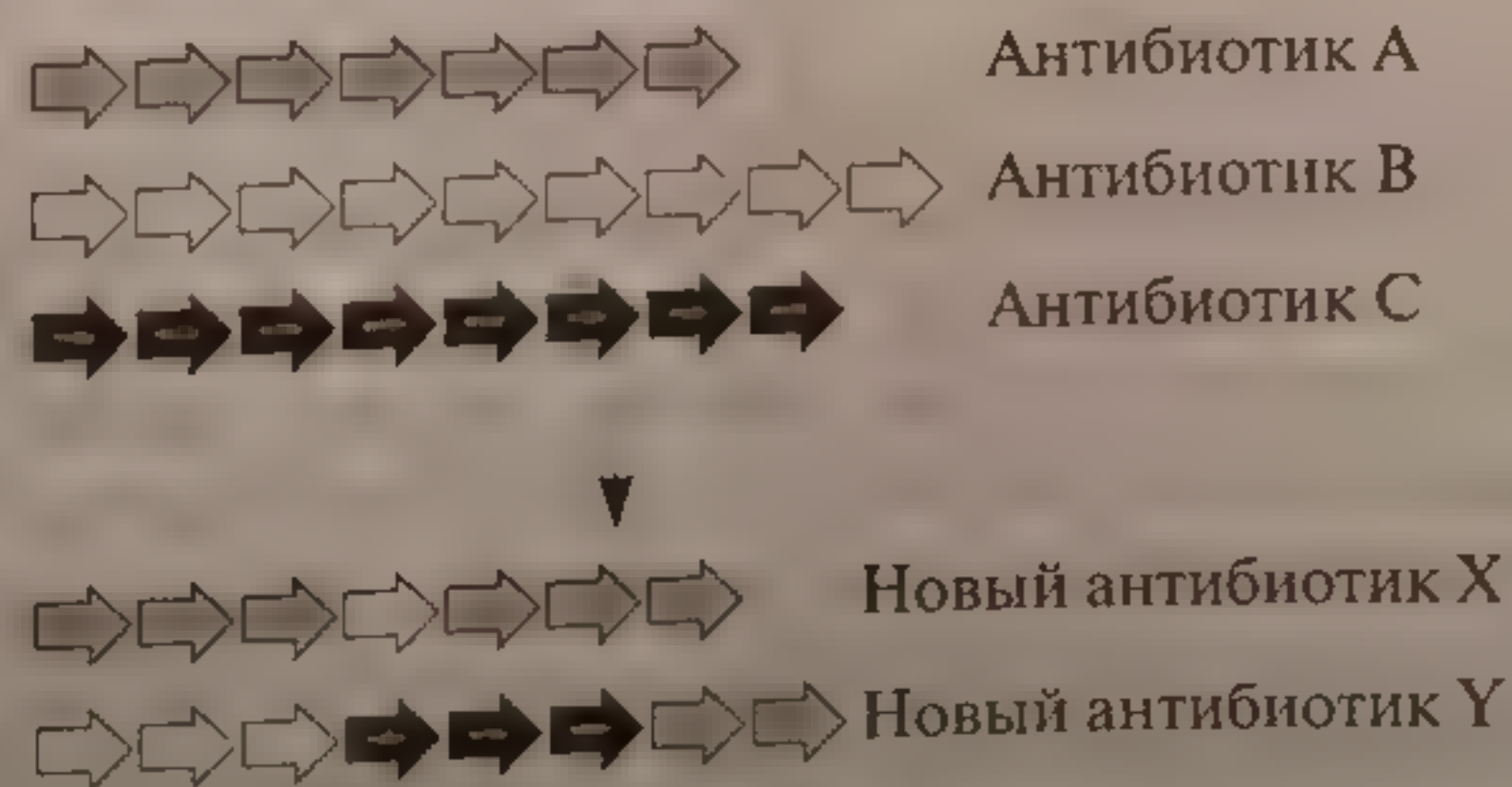


Рис. 7-10 Создание новых антибиотиков путем перемещения генов для синтеза антибиотиков.

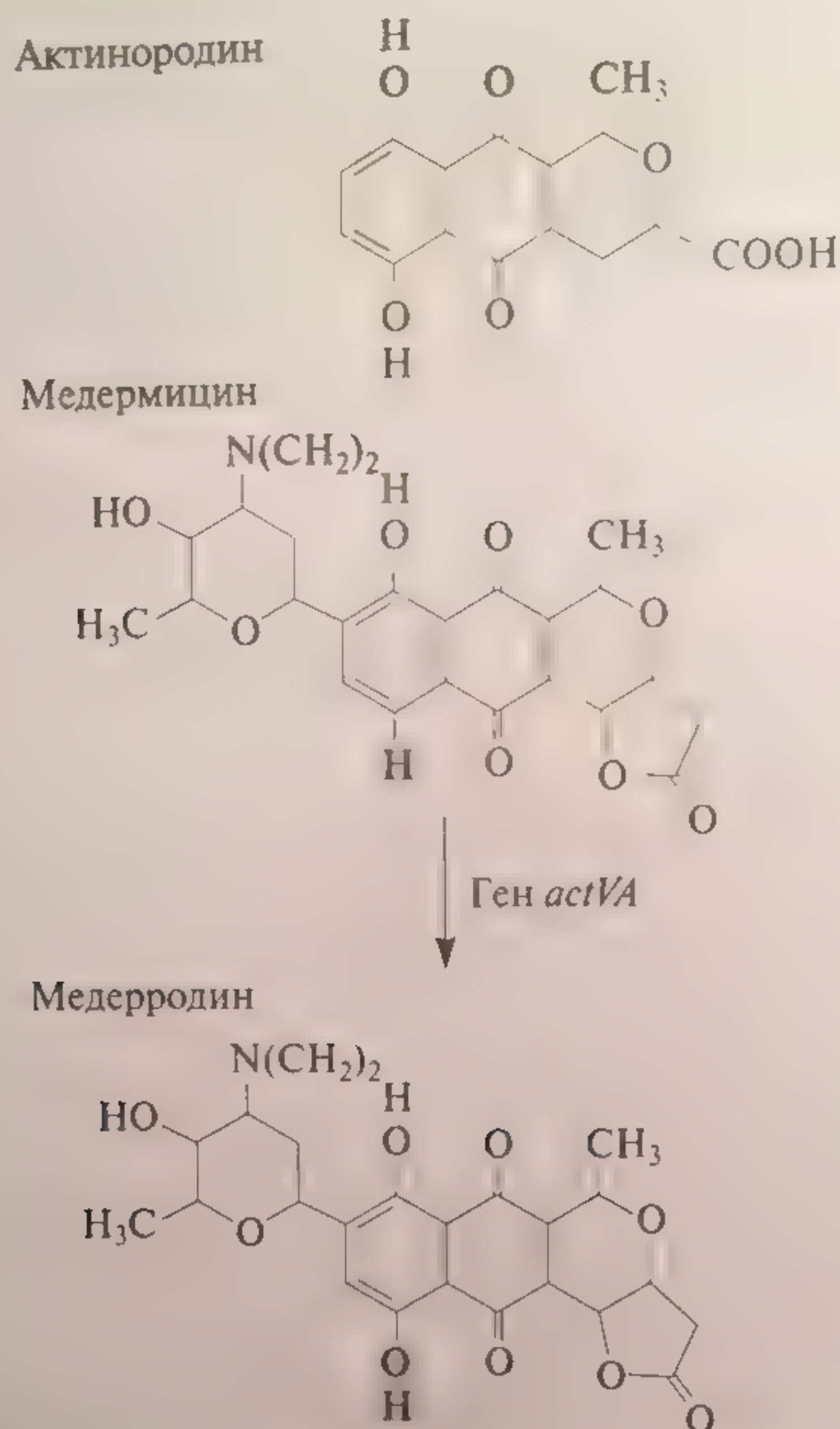


Рис. 7-11 Образование нового антибиотика медерродина из медермицина под действием продукта гена *actVA*.

выделены из нескольких различных организмов, стало возможным перемещать гены показанным на рис. 7-10 способом и создавать тем самым новые молекулы. Например, путем смешивания генов для синтеза актинородина с генами для получения гранатицина и медеpmицина удалось получить два новых антибиотика: медеpmродин А и дигидрогранатиродин (рис. 7-11). Можно сделать шаг еще дальше: клонированные гены можно подвергнуть статистическому мутагенезу, а затем попытаться найти ПКС с новыми активностями.

Другой путь создания новых поликетидов заключается в том, чтобы заставить ПКС-ферменты не участвовать в преимущественном процессинге соединений, продуцируемых хозяином. Это осуществляется изменением гена таким образом, чтобы первая стадия удлинения первым модулем была блокирована. В результате предотвращается продукция предшественника второй стадии и природный биосинтез эффективно блокируется. Клетки начинают обрабатывать синтетические предшественники, и те предшественники, которые могут служить субстратами, превращаются ПКС-ферментами в новые метаболиты. Такая процедура известна как **химический биосинтез**.

Метаболизм лекарств

Большинство лекарств метаболизируется организмом сразу после введения; есть два аспекта этого метаболизма. Первый — скорость метаболизма. Если лекарство метаболизируется слишком быстро, оно может оказаться неэффективным. Если оно метаболизируется слишком медленно, оно может накапливаться в организме, и каждая последующая доза повышает его токсичность. Этот аспект метаболизма контролируется реципиентом на генном уровне и был описан в гл. 4 в разделе по фармакогеномике (см. с. 143). Другой важный аспект — природа метаболитов, которые образуются после введения. Если известно, что эти метаболиты токсичны для людей или имеют общие с известными ядовитыми веществами молекулярные характеристики, то дальнейшая разработка лекарства должны быть остановлена.

Стандартный метод определения метаболического пути нового лекарства — введение его радиоактивно меченного варианта в специально отобранные особи животных и дальнейший анализ меченых соединений в моче и фекалиях с помощью специальных аналитических методов. В таких исследованиях очень важно использовать животных, метаболизм которых имеет наибольшее сходство с метаболизмом человека. Важность этого продемонстрирована секвенированием генома мыши (см. дополнение 4-2), которое показало, что по сравнению с человеком мышь имеет больше генов для метаболизма ксенобиотиков. Таким образом, мышь может метаболизировать лекарство другим путем, отличным от человеческого. Были секвенированы геномы многих других животных, используемых для оценки лекарств, и теперь после завершения этой работы мы можем выяснить, какие животные являются наилучшими кандидатами для тестирования.

Описанная выше методология является трудоемкой и дорогостоящей, поэтому желательно проводить какой-либо прескрининг. Один из путей проведения такого прескрининга — использование рекомбинантных клеток, несущих гены человеческих ферментов, участвующих в метаболизме лекарств, например цитохромов P450. Гены этих цитохромов были клонированы в *E. coli*, дрожжах и животных клетках, что облегчило исследование метаболизма. Выращивают культуру рекомбинантных клеток, добавляют лекарство и после соответствующего инкубационного периода метаболиты определяют масс-спектрометрически без необходимости экстрагировать их из неприятных носителей (типа фекалий). Если метаболиты с известной или предполагаемой токсичностью идентифицированы, то дальнейшие исследования на живых организмах нежелательны.

Токсикогеномика

Безопасность новых лекарств для человека оценивается путем введения лекарств животным и последующего выявления любых неблагоприятных анатомических, гистологических или биохимических измене-

ний. Такой процесс очень трудоемкий и дорогостоящий и не дает 100% гарантии, так как несколько перспективных терапевтических препаратов были удалены с фармацевтического рынка из-за непредвиденной токсичности для человека. Кроме того, разработка лекарств находится на такой стадии, когда существует еще очень много узких мест, и поэтому очень приветствовалось бы появление высокопроизводительных методов, позволяющих предсказывать реакцию человеческого организма на лекарство. Один такой метод — **токсикогеномика**: исследование изменений в экспрессии генов после введения в организм лекарственного кандидата. Токсикогеномика дает возможность идентифицировать ядовитое для человека вещество на ранней стадии процесса его разработки и детектировать специфичные для человека яды, которые не вызывают неблагоприятных реакций у крыс.

Существует два основных пути сбора данных по генной экспрессии и использования их для предсказания токсичности. В первом случае идентифицируют те гены, которые экспрессируются после введения тестируемого лекарства и сравнивают результат с тем, который был получен при введении одного или более других лекарств того же класса, токсичность которых для человека уже известна. Во втором случае создается большая база данных по экспрессии для имеющихся на рынке фармацевтических препаратов, классических ядов и запатентованных лекарств, и это охватывает широкий диапазон фармакологических и структурных классов. Эти данные анализируют и используют для создания алгоритмов, которые позволяют предсказать токсичность нового соединения. Какой бы метод ни использовался, нужно позаботиться о том, чтобы разграничить фармакологические и токсикологические эффекты путем анализа многократных доз каждого вещества.

В качестве примера использования токсикогеномики рассмотрим три лекарства (такрин, донепезил и физостигмин), которые были разработаны для лечения болезни Альцгеймера путем ингибирования ацетилхолинэстеразы. Во время преклинических испытаний на мышах, крысах или собаках не было получено указаний на токсичность какого-либо из этих веществ для печени. Однако у 25% людей, которых лечили такрином, обнаружилось бессимптомное повышение уровня сывороточной аминотрансферазы, а биопсия обнаружила некроз печени. По этой причине такрин рассматривается как специфичный для человека яд (рис. 7-12). Токсикогеномные алгоритмы правильно предсказали, что животные, которых подвергали действию высоких доз такрина, были подвергнуты действию яда. Животные, которых подвергли действию донепезила, физостигмина или низких доз такрина, обозначены как не подвергшиеся токсическому воздействию.

Исследования генной экспрессии в рамках токсикогеномики были предприняты с использованием микрочипов. Первоначально подборка используемых генов соответствовала тем, которые были на коммерческих микрочипах. Однако по мере накопления данных о свойствах большого количества лекарств, были установлены конкретные гены и семейства ге-

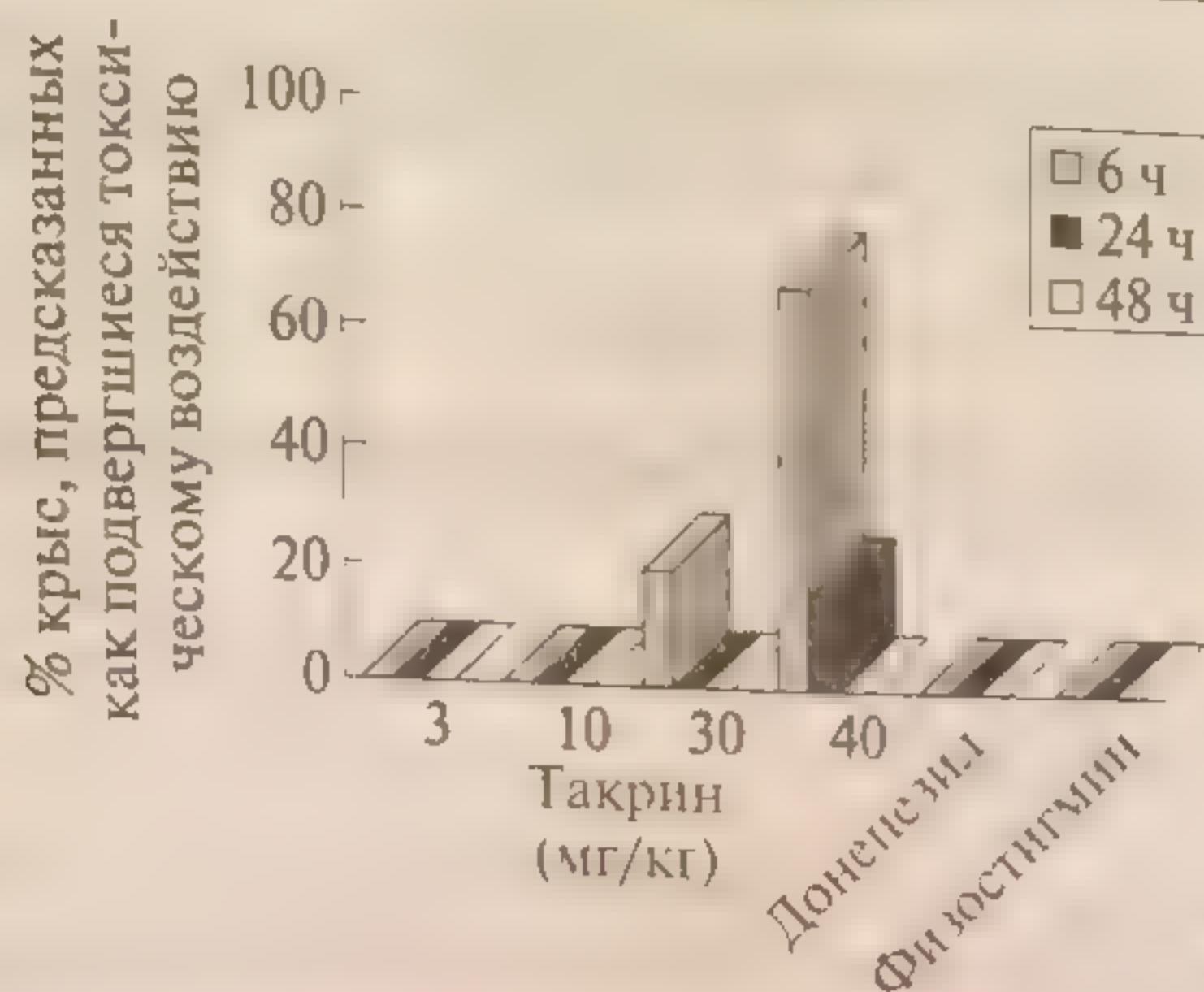


Рис. 7-12 Животным однократно оральным путем вводили дозы такрина, донепезила или физостигмина, а затем убивали через 6, 24 или 48 ч. С использованием моделирующих компьютерных программ идентифицировали процент животных, подвергшихся действию токсических или нетоксических веществ.

нов, связанные с токсичностью. Конечная цель — получить микрочипы, несущие только те гены, экспрессия которых меняется при введении токсических веществ.

Дополнительная литература

POGM: В гл. 5 детально описываются методы получения конструкций, в которых гены оказываются под контролем регулируемых промоторов, а в гл. 11 описываются методы направленного введения мутаций в гены лабораторных животных.

POGA: В гл. 9 детально описаны различные методы контроля генной экспрессии, что является дополнением к данной главе.

Abuin A, Holt KH, Platt KA *et al.* (2002) Full-speed mammalian genetics: *in vivo* target validation in the drug discovery process. *Trends Biotechnol* 20, 36–42.

Две статьи, посвященные различным аспектам токсикогеномики, взаимно дополняют друг друга:

Bandara LR, Kennedy S (2002) Toxicoproteomics - a new preclinical tool. *Drug Discovery Today* 7, 411–418.

Castle AL, Carver MP, Mendrick DL (2002) Toxicogenomics: a new revolution in drug safety. *Drug Discovery Today* 7, 728–736.

Battersby BJ, Trau M (2002) Novel miniaturized systems in high-throughput screening. *Trends Biotechnol* 20, 167–173.

Великолепный обзор, написанный ведущими специалистами в этой области:

Blundell TL, Jhoti H, Abell C (2002) High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nature Rev Drug Discovery* 1, 45–54.

Croston GE (2002) Functional cell-based uHTS in chemical genomic drug discovery. *Trends Biotechnol* 20, 110–115.

Великолепный обзор, написанный одним из наиболее уважаемых сотрудников фармацевтической компании R&D. В том же выпуске *Science* имеется серия других статей по геномике и выявлению лекарств:

Drews J (2000) Drug discovery: a historical perspective. *Science* 287, 1960–1964.

Goodnow RA (2001) Current practices in generation of small molecule new leads. / *Cell Biochem* 37 (Suppl), 13–21.

Knowles J, Gromo G (2003) A guide to drug discovery: target selection in drug discovery. *Nature Rev Drug Discovery* 2, 1–10.

Обзор посвящен основам комбинаторного биосинтеза и химического биосинтеза:

Pfeifer BA, Khosla C (2001) Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 106–118.

Ramstrom O, Lehn J-M (2002) Drug discovery by dynamic combinatorial libraries. *Nature Rev Drug Discovery* 1, 26–36.

Rubinsztein DC (2002) Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet* 18, 202–209.

Генная и клеточная терапия

Введение

Большинство обычных лекарств — либо белки, либо малые молекулы, которые взаимодействуют с белками. Другими словами, лекарства действуют на уровне белков, а не на уровне кодирующих генов. В случае инфекционных болезней или рака ожидаемый эффект от лечения обычными лекарствами — это полное выздоровление (в лучшем случае), т. е. патоген или группа аномальных клеток должны быть полностью уничтожены. Однако при наследственных болезнях лекарства способны лечить лишь **симптомы**, в то время как лежащий в основе заболевания дефект гена остается неизменным. Альтернативным подходом является **генная терапия**: использование нуклеиновых кислот с целью репарации поврежденной последовательности ДНК или по крайней мере внесения компенсаторного изменения, которое восстановит нормальные физиологические функции клетки. Генная терапия — одно из новых направлений **генной медицины**, когда нуклеиновые кислоты вводятся в человеческие клетки. Другое направление генной медицины основано на применении нуклеиновых кислот традиционным способом — как обычные лекарства, но в данном случае в роли мишени часто выступает мРНК, копируемая с поврежденного гена, а не белок. Кроме того, использование **ДНК-вакцин**, экспрессирующих в организме антигены, также относят к генной медицине.

Генная терапия по своей сути представляет собой подход, противоположный созданию животных **моделей болезни** путем мутагенеза. В последнем случае мутации, эффект от которых напоминает человеческие болезни, сознательно генерируются у животных (с использованием технологии переноса генов), что позволяет исследовать биохимические и физиологические аспекты заболевания и анализировать эффективность действия новых лекарств. Многие из методов генной терапии и при моделировании болезней основаны на одних и тех же принципах, хотя и применяются с разными целями. Некоторые модели болезни можно получать с использованием нуклеиновых кислот и белков, подавляющих экспрессию генов или белковую активность.

И соматическая, и зародышевая генная терапия поднимают ряд важных этических проблем, из них наиболее распространенная — возможность злоупотреблений. Генная терапия может быть использована не только для лечения серьезных заболеваний (или устранения их в семейных линиях в случае зародышевой терапии), но также для усиления благоприятных признаков (положительных свойств) и подавления неблагоприятных. Самое «безобидное», к чему это может привести — появление **спроектированных детей** со свойствами, выбранными родителями. Но не так уж нереально то, что генная терапия может быть использована для манипуляции с генетическими структурами всей популяции (**евгеника**). Есть весомые моральные аргументы в пользу применения генной терапии для лечения тех болезней, которые невозможно вылечить другими средствами, однако при этом важно знать, исчезнут ли болезни и появятся ли признаки выздоровления. А если бы генную терапию захотели использовать для повышения коэффициента интеллекта IQ ребенка

с 40 до 100, то чем бы это следовало считать: лечением болезни или улучшением генетики? И кто будет решать, какое применение генной терапии приемлемо, а какое нет?

В случае зародышевой генной терапии возникают две другие этические проблемы:

1. Несовершенная технология. Результат переноса стабильного гена непредсказуем, и даже если конкретная болезнь будет вылечена, случайно могут быть внесены другие дефекты. Печальные последствия недавно проведенного пробного использования зародышевой генной терапии для лечения SCID (синдром тяжелого комбинированного иммунодефицита) являются ярким примером потенциальной опасности, которую несет зародышевая генная терапия (см. основной текст).

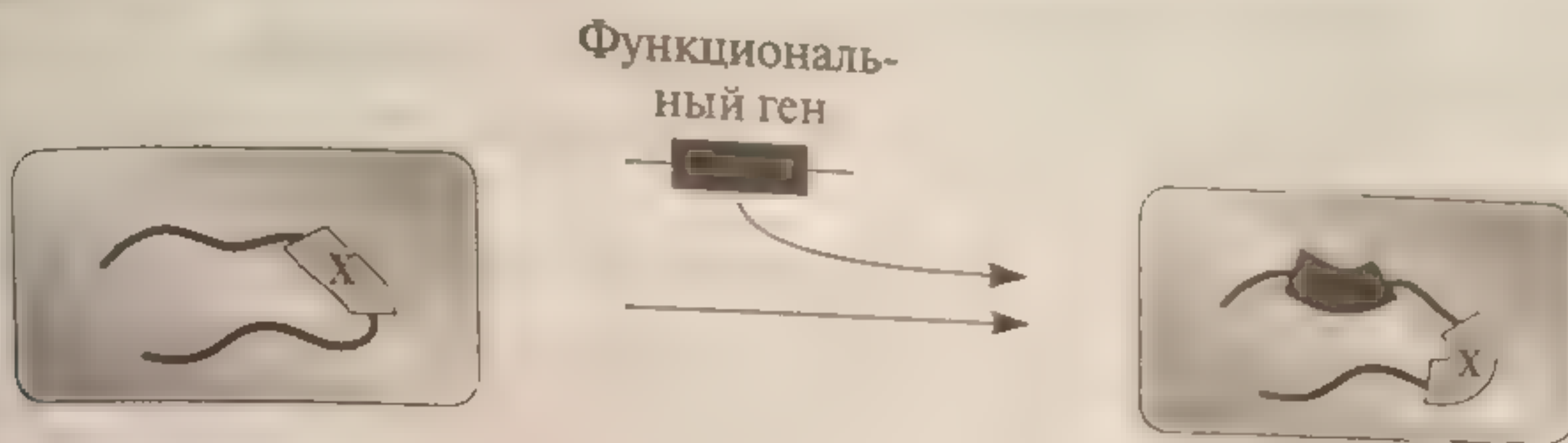
2. Отсутствие права принимать решение. Индивидуумы, подвергшиеся действию зародышевой терапии, не могут давать свое согласие на то, чтобы их генетический материал был модифицирован. Это является нарушением прав человека.

Технология переноса генов все больше сближается с клеточной терапией с использованием целых клеток, полученных либо из пациента, либо из другого источника в качестве терапевтического средства. Как генная терапия, так и клеточная, являясь, возможно, наиболее перспективными терапевтическими подходами к лечению долготекущих болезней, поднимают важные этические проблемы и проблемы безопасности, над которыми следует задуматься (дополнение 8-1).

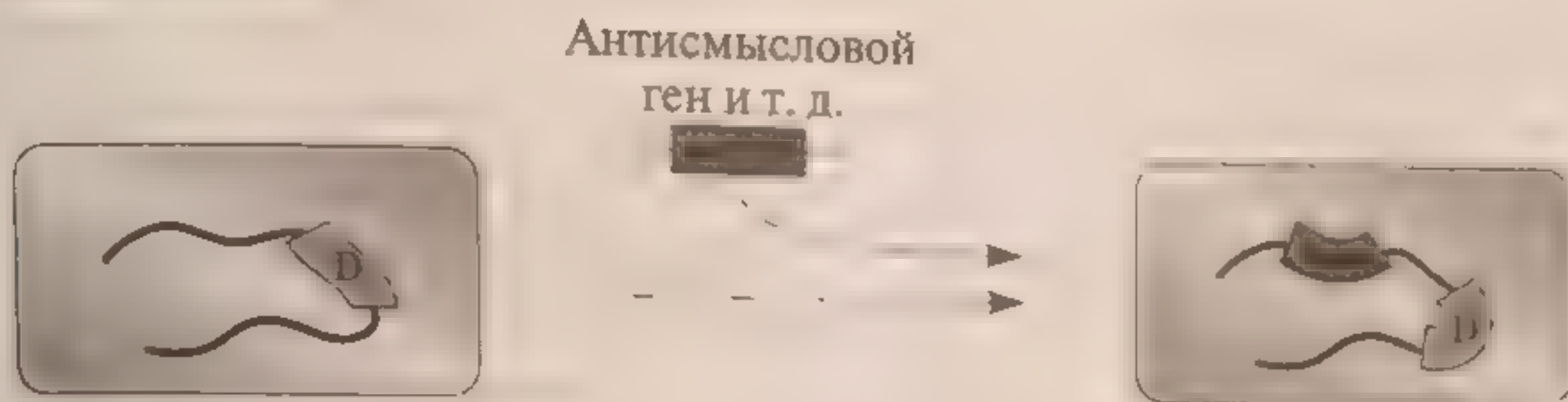
Генная терапия

Генная терапия определяется как терапевтический подход, при котором клетки пациента генетически модифицируются с целью облегчить течение болезни. Существует важное различие между **соматической генной терапией**, когда модификации вводятся в соматические клетки и ограничены организмом пациента, и **зародышевой генной терапией**, когда модификации вводятся в клетки, дающие гаметы, и, таким образом, могут передаваться другим поколениям. В настоящее время правовые основы имеет только соматическая генная терапия. Хотя могут существовать неопровержимые аргументы в пользу применения зародышевой генной

1 Добавление гена



2 Ингибирование гена



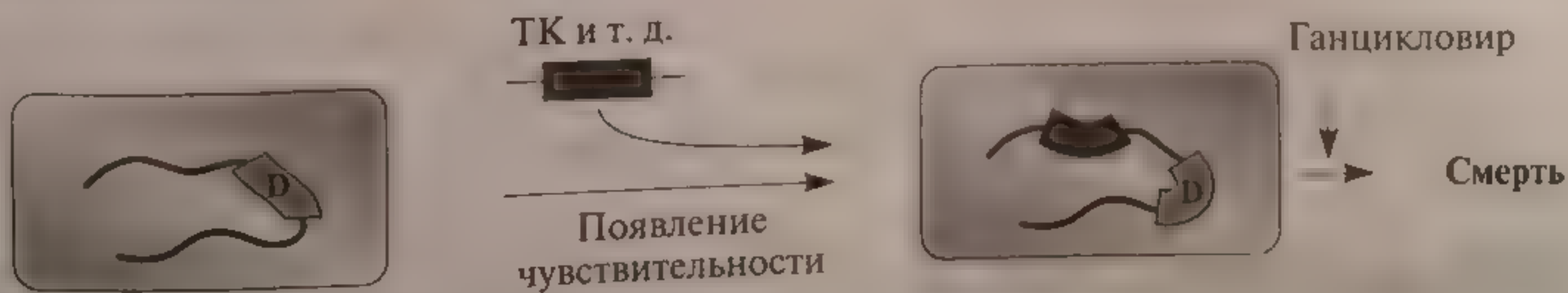
3 Заместительная генная терапия



4 Помощь в уничтожении специфических клеток



5 Уничтожение специфических клеток путем превращения пролекарства в лекарство



- X — мутантный ген (болезнь) — потеря функции
- D — мутантный ген (болезнь) — доминантное приобретение функции

Рис. 8-1 Обзор методов генной терапии.

терапии при некоторых исключительных обстоятельствах (например, когда родитель уверен, что передал своему потомку мутацию, вызывающую болезнь), сама процедура повсеместно запрещена по этическим соображениям (дополнение 8.1).

Известны несколько методов соматической генной терапии, и в зависимости от природы болезни выбирают наиболее подходящий (рис. 8-1).

- **Добавление гена.** Этот метод генной терапии используется для лечения наследственных болезней, вызываемых потерей продукта функционального гена. Задача терапии — добавить в геном функциональную копию потерянного или мутированного гена и экспрессировать этот ген на достаточном уровне, чтобы восполнить отсутствующий белок. Метод применим лишь в том случае, если последствия болезни обратимы.

- **Ингибирование гена.** Этот метод генной терапии пригоден для лечения инфекционных и наследственных болезней, рака, если они вызваны неадекватной активностью гена (активность гена чрезмерна). Задача терапии — введение нового гена, продукт которого ингибирует экспрессию патогенного или поврежденного гена или подавляет активность продукта.

- **Заместительная генная терапия.** Этот метод генной терапии пригоден для лечения только наследственных заболеваний (ни в коем случае нельзя использовать в случае инфекционных болезней или рака), но может быть использован для лечения болезней, характеризующихся как потерей, так и приобретением функции генов. Задача — ввести нормальную функционирующую копию дефектного целевого гена, а затем заставить экзогенную ДНК рекомбинировать с целевым геном с целью замещения последнего. Потенциально это самый простой путь исправления генетических дефектов, однако он основан на гомологичной рекомбинации, которая в большинстве клеток протекает с крайне низкой эффективностью.

- **Уничтожение специфических клеток.** Этот метод терапии пригоден для лечения болезней (таких как рак), которые можно лечить путем устранения определенных популяций клеток. Основная задача этой терапии — экспрессировать внутри таких клеток **ген-самоубийцу**, продукт которого токсичен. Один из подходов — экспрессия белка — делает клетки уязвимыми для атаки иммунной системы. Другой подход включает экспрессию фермента, который превращает безвредное вещество (пролекарство) в более токсическое соединение. Из-за летального эффекта, вызываемого генами-самоубийцами, их действие должно быть с особой тщательностью направлено на целевые клетки, чтобы избежать побочных эффектов.

Пути доставки генов

Генетические болезни обычно проявляются в специфических популяциях клеток. Иногда, как в случае рака, это происходит из-за того, что вызывающая болезнь мутация присутствует во всех клетках, но эффект ограничен лишь теми клетками, где этот ген экспрессируется (или где нор-

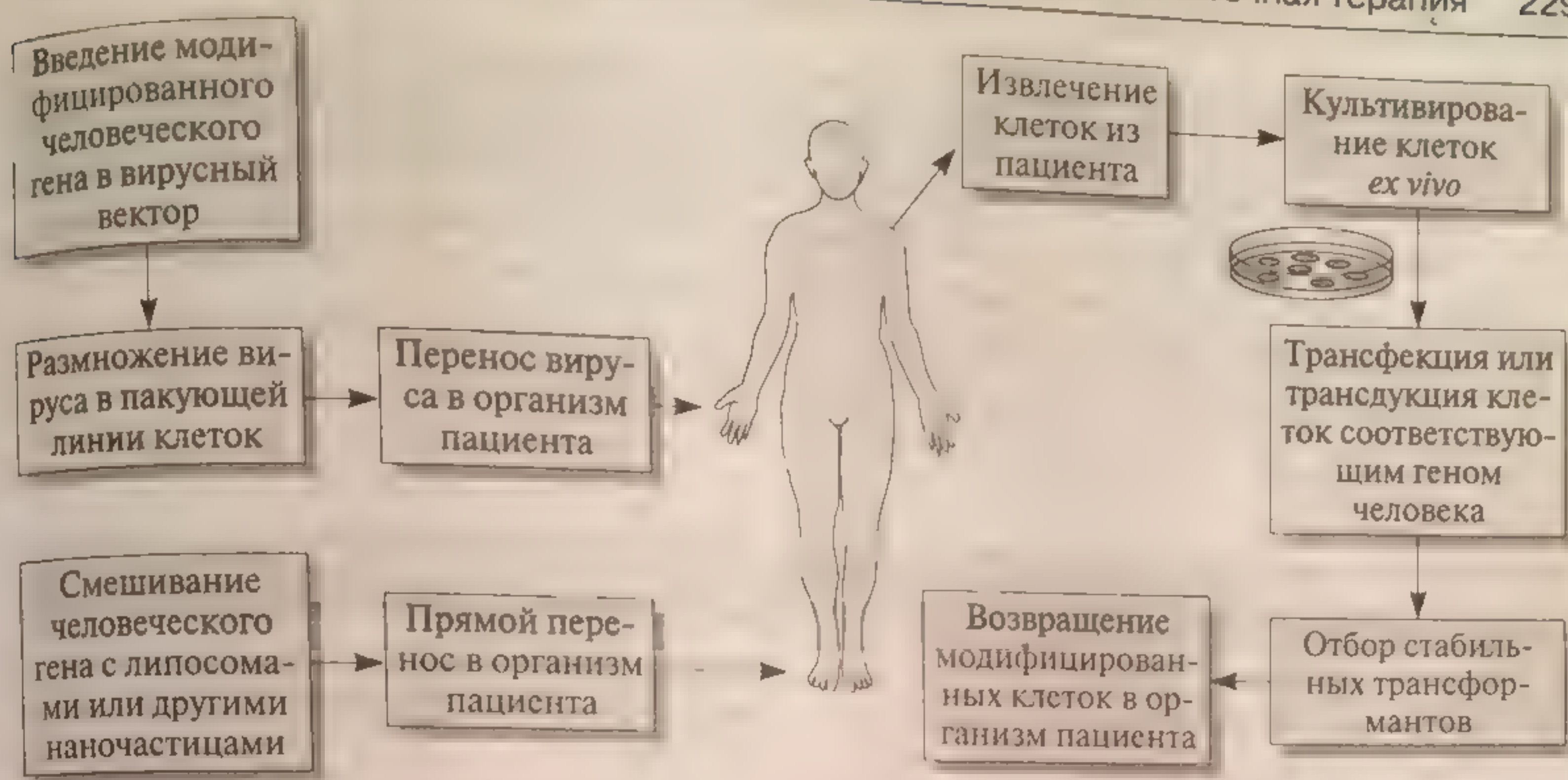


Рис. 8-2 Подходы генной терапии. Слева — принцип генной терапии *in vivo* с использованием вирусного и невирусного векторов. Справа — принцип генной терапии *ex vivo* с использованием вирусного и невирусного векторов.

мальная экспрессия гена утрачена). Выбор метода доставки ДНК при генной терапии, следовательно, зависит в значительной степени от доступности **соответствующих клеток** (рис. 8-2).

Если есть возможность извлечь и культивировать клетки, не нанося вред пациенту, то их можно генетически модифицировать в культуре, а затем снова ввести в организм пациента. Такой подход, называемый **генная терапия *ex vivo***, применим для лечения заболеваний крови и иммунной системы, поскольку гемопоэтические стволовые клетки относительно легко можно извлекать, культивировать и видоизменять. Более того, будучи введенными обратно в организм пациента они сохраняются в течение длительного времени и, следовательно, могут дать неограниченное число (генетически модифицированных) дочерних клеток. Генная терапия *ex vivo* позволяет тщательно контролировать целевые клетки в культуре, так что можно отобрать клетки с нужным типом генетической модификации. В случае недоступных клеток или клеток, которые невозможно эффективно культивировать, генная терапия включает прямое введение ДНК в клетки, находящиеся в организме. Такой подход называется **генной терапией *in vivo***, а система доставки гена должна быть эффективной и селективной для конкретного типа клеток-мишеней. Это особенно важно, если задачей является уничтожение данных клеток.

Механизмы доставки генов

Кроме общей стратегии доставки генов, необходимо рассмотреть механизм введения нуклеиновых кислот в клетку. Механизмы переноса генов, используемые в генной терапии, могут быть **вирусные** и **невирусные**.

Вирусная доставка, известная также как **трансдукция**, включает упаковку ДНК (или в некоторых случаях РНК) в вирусную частицу. Перенос генов осуществляется путем нормальной вирусной инфекции и потому эффективен и селективен по отношению к клеткам. По этой причине доставка с помощью вирусов наиболее предпочтительна при генной терапии *in vivo*. Сравнение различных вирусов, используемых или разрабатываемых в качестве векторов для генной терапии, приводится в дополнении 8-2.

Дополнение 8-2. Сравнение различных типов вирусных векторов для генной терапии

Вирусные векторы для генной терапии оцениваются по их эффективности, способности выдерживать чужеродную ДНК, безопасности, механизму трансформации (эписомальный или интеграционный), персистенции и тропизму. Ни один из вирусов не является универсальным вектором (не отвечает всем требованиям), хотя интерес к созданию гибридных вирусов, сочетающих наилучшие свойства различных типов векторов, возрастает.

Аденовирусы

Это вирусы, которые вызывают легкие формы инфекций верхних дыхательных путей, т. е. обычные простуды. Трансформация происходит эписомальным путем, и вирус может инфицировать широкий диапазон делящихся и неделящихся клеток. **Преимущества:** эффективность (могут быть получены высокие титры); емкость (до 35 тыс. п. н. чужеродной ДНК). **Недостатки:** персистенция (обычно наблюдается кратковременная экспрессия, хотя недавно полученные векторы имеют большую продолжительность жизни и очень полезны для длительной экспрессии генов в нейронах); небезопасность (как было показано, аденовирусные векторы вызывают воспалительные реакции у некоторых пациентов). Такая воспалительная реакция привела к смерти 18-летнего Джесси Гельзингера во время фазы I испытаний генной терапии для лечения наследственного заболевания печени — дефицита орнитин-транскарбамилазы (OTD). Все испытания методов генной терапии с участием аденовируса были приостановлены для изучения вопросов безопасности. После прове-

дения испытаний выяснилось, что других данных о тяжелых реакциях на вирус не поступало.

Аденоассоциированные вирусы

Аденоассоциированные вирусы (ААВ) содержат одноцепочечную ДНК и вызывают асимптоматические инфекции. Трансформация происходит путем устойчивой интеграции, и вирус может инфицировать широкий диапазон делящихся и неделящихся клеток. **Преимущества:** безопасность (вирус требует присутствия аденовируса или вируса герпеса для репликации, так как от природы не обладает способностью к репликации); персистенция (устойчивая интеграция способствует длительной экспрессии). **Недостатки:** малая емкость (может удерживать ДНК размером менее 5 тыс. п. н.). Вирус дикого типа обладает интересным свойством, обеспечивающим безопасность работы с ним: он может интегрировать в строго определенное место человеческого генома, расположенное в хромосоме 19, уменьшая тем самым риск инсерционного мутагенеза (см. ниже ретровирусы). К сожалению, это свойство обеспечивается вирусным белком Rep, но ген *her* должен быть делетирован, чтобы обеспечить место чужеродной ДНК.

Бакуловирусы

Это ДНК-содержащие вирусы, которые обычно инфицируют насекомых, но могут инфицировать и человеческие клетки. Трансформация эписомальная, и хотя в первоначальных сообщениях говорилось о том, что преимущественно инфицируются

клетки печени, сейчас выясняется, что вирус способен инфицировать гораздо более широкий диапазон клеток. **Преимущества:** безопасность (вирус инфицирует человеческие клетки, но не может в них реплицироваться); большая емкость (вирус имеет папочковидный капсид, поэтому нет верхнего предела для размеров удерживаемой чужеродной ДНК). **Недостатки:** эффективность (вирус чувствителен к комплемент-опосредованной инактивации, хотя были разработаны подходы к преодолению этого недостатка). В отличие от других четырех типов обсуждаемых вирусов, бакуловирусам еще предстоит пройти испытания в генной терапии.

Вирусы герпеса

Вирус простого герпеса (ВПГ) — ДНК-содержащий вирус, который проявляет повышенный (ярко выраженный) нейротропизм, что делает его особенно привлекательным для генной терапии заболеваний нервной системы. Трансформация эпистомальная, и вирус может распространяться через синаптическую сеть. **Преимущества:** большая емкость (точный верхний предел для встраивания чужеродной ДНК не установлен); персистенция (могут установиться пожизненные латентные инфекции в нейронах).

Ретровирусы

Ретровирусы — РНК-содержащие вирусы, имеющие обратную транскриптазу, даю-

щую возможность синтезировать «ДНК-копию их генома». Эта копия интегрируется в геном хозяина, приводя к стабильной трансформации и длительной экспрессии перенесенных генов. Типичные ретровирусы инфицируют только делящиеся клетки, поэтому они особенно пригодны для генной терапии рака. Однако векторы, основанные на лентивирусах (таких как ВИЧ), могут инфицировать неделящиеся клетки. **Преимущества:** эффективность (может быть получен высокий титр вируса, и очень высокая эффективность инфекции); персистенция (стабильная интеграция делает возможной долговременную экспрессию генов). **Недостатки:** малая емкость (может удерживать чужеродную ДНК размером не более 8 тыс. п. н.); небезопасность (интеграция происходит случайным образом, и возникает опасность инсерционного мутагенеза). Механизм интеграции может приводить к активации прилегающих генов, включая онкогены, что именно и произошло во время проводимых недавно испытаний генной терапии SCID (синдрома тяжелого комбинированного иммунодефицита) (см. основной текст). Другая проблема безопасности связана с использованием ВИЧ для конструкции векторов; это единственный вирус, используемый для генной терапии, который, как известно, вызывает смертельные болезни. Следовательно, необходимо принимать чрезвычайные меры безопасности, чтобы избежать возникновения путем рекомбинации способных к репликации вирусов.

Важно помнить, что по своей природе вирусы патогенны. Поэтому необходимо принять меры, чтобы при использовании их в качестве векторов они не могли вызвать заболевания. Обычный способ достижения этой цели — удаление генов и получение вирусов с **нарушенной репликацией** — подход, который, ко всему прочему, увеличивает способность вирусов удерживать чужеродную ДНК. Для получения больших количеств таких дефектных вирусов недостающие функции должны быть получены из другого источника. Это подразумевает использование вируса-помощника, компенсирующего отсутствие генов, но чаще всего используется пакующая линия клеток, т. е. клеточная линия, которая стабильно трансформируется необходимыми вирусными генами (рис. 8-3). Как только ДНК упакована, дефектный вирус может быть выделен из пакующей линии. Он способен инфицировать клетку-мишень и вводить в нее чужеродную ДНК.

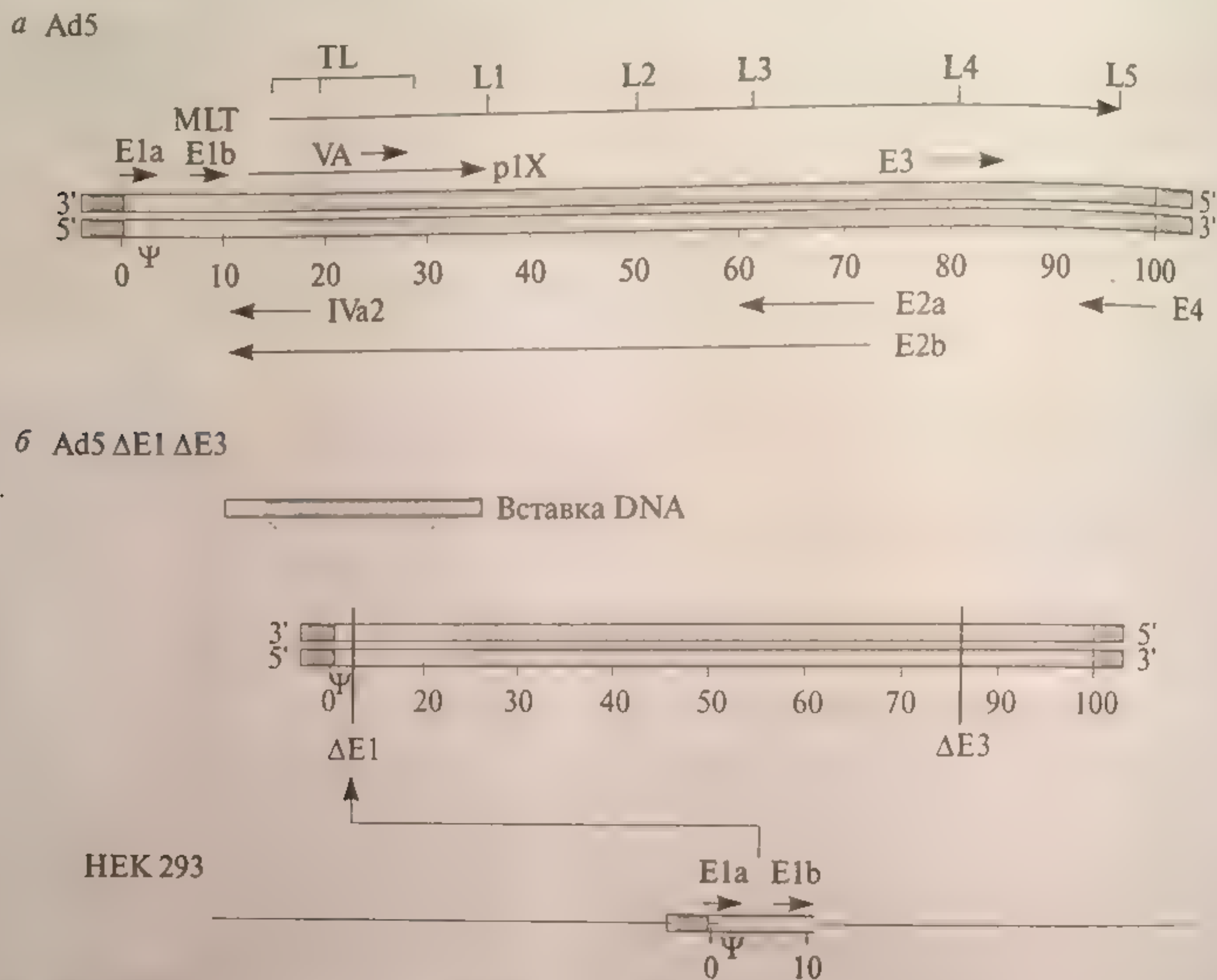


Рис. 8-3 а — карта генома аденовируса Ad5 дикого типа. Расположенные под картой числа делят геном на 100 условных единиц. Стрелками указаны транскрипционные единицы. Е — ранние транскрипты; I — промежуточные транскрипты; MLT — главный поздний транскрипт; TL — трехкомпонентная лидерная последовательность, которая в процессе сплайсинга присоединяется к поздним транскриптам; б — ранний аденовирусный вектор, в котором районы E1 и E3 удалены, чтобы обеспечить встраивание чужеродной ДНК. Район E3 несуществен, E1 — существен, и его отсутствие делает вирус дефектным по репликации. Отсутствующие функции компенсируются пакующей линией клеток HEK 293, которая содержит находящийся в левой части генома участок (11% от размера генома), включающий район E1.

или РНК, но не может реплицироваться и вызывать симптомы болезни. При создании пакующих линий должны быть приняты меры предосторожности, чтобы избежать рекомбинации между дефектными вирусами и генами, обеспечивающими вспомогательные функции, в противном случае могут возникать способные к репликации вирусы.

Невирусные методы доставки генов считаются более безопасными, чем вирусные. Они включают **трансфекцию** (клетки заставляют поглощать ДНК из окружающей среды) и **прямой перенос** (ДНК вводится в клетки физическим путем, например инъекцией). ДНК не упаковывается в вирусный вектор, а часто присутствует в составе плазмиды. В некоторых случаях плазида сконструирована таким образом, что не способна реплицироваться в человеческих клетках, и тогда единственный путь достижения долгосрочной экспрессии — стабильная интеграция ДНК в геном.

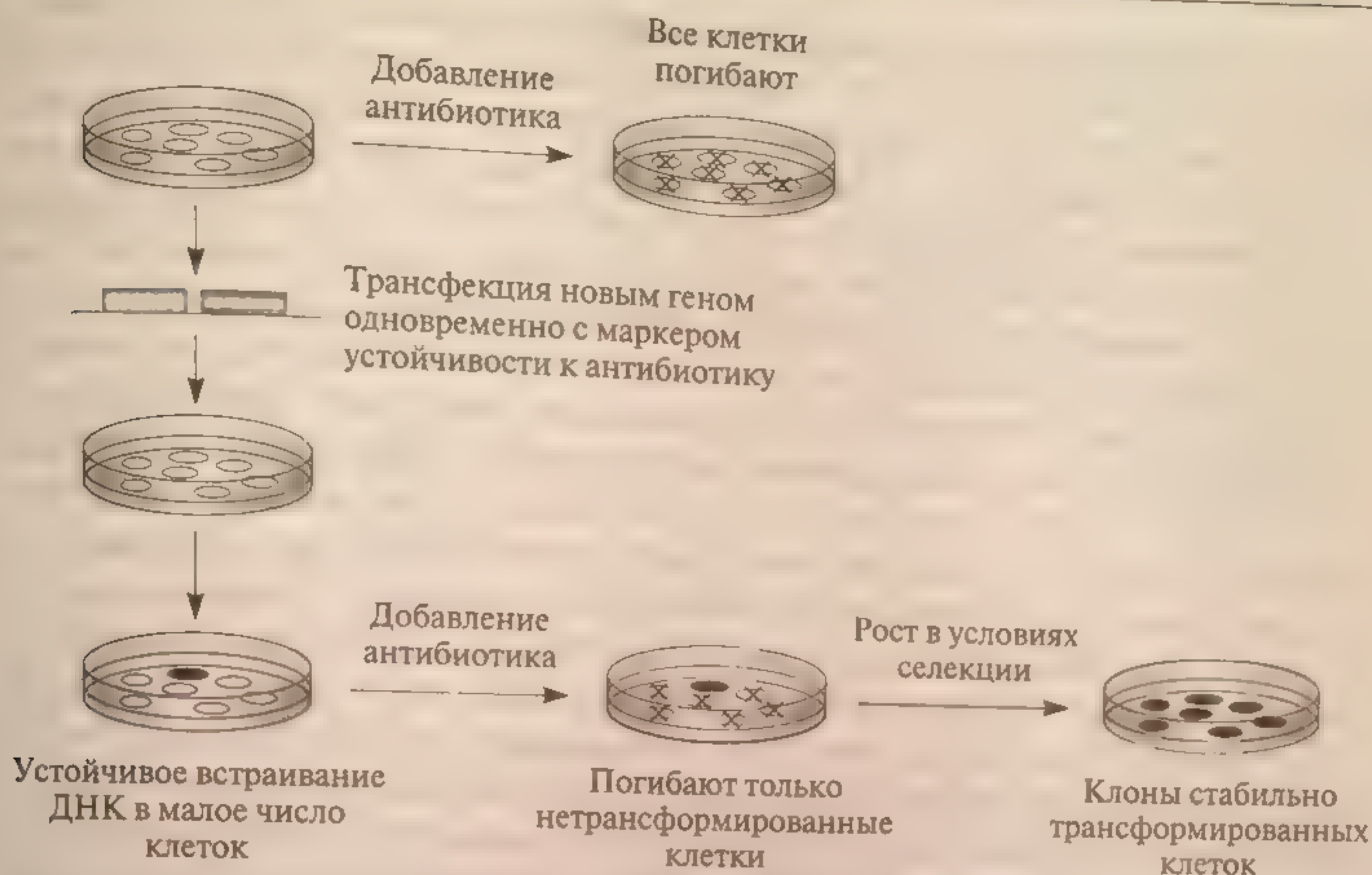


Рис. 8-4 Использование селективных маркеров для отбора трансформированных клеток. На чашку с культурой человеческих клеток добавляют антибиотик G418, и все клетки погибают. Однако, если клетки трансфецировать селективным маркерным геном *neo*, который обеспечивает устойчивость к таким антибиотикам как G418, то очень небольшое число клеток со стабильно интегрированной ДНК, выживет. Это можно использовать для селекции клеток, трансформированных другими генами. Два гена (селективный маркер и неселектируемый ген) вводятся одновременно и потенциально могут совместно интегрироваться в геном. Поэтому селекция на устойчивость к антибиотику позволяет идентифицировать клетки, несущие также и неселектируемый ген. Эти клетки будут расти в условиях селекции, а клетки без новых генов погибнут.

Это очень редкое событие (стабильно трансформируется менее одной клетки на миллиона), так что редкие клетки должны быть отобраны путем введения маркерного гена в трансформирующую ДНК, что дает возможность клеткам расти в присутствии такого вещества как антибиотик, токсичный для нетрансформированных клеток (рис. 8-4). Очевидно, что этот подход может быть применен только к клеточной культуре.

Для невирусной генной терапии *in vivo*, необходимо встроить сайт начала репликации вируса в плазмидный вектор, чтобы вектор мог существовать в трансформированной клетке как эписомальный репликон. Удержание эписомы продолжается не бесконечно (дополнение 8-2), и экспрессия введенного гена поэтому может быть кратковременной. Чтобы обеспечить перенос *in vivo*, ДНК обычно заключают в какой-нибудь комплекс, который может быть введен в клетки-мишени, или стимулируют ее захват клетками путем эндоцитоза. Например, ДНК может быть заключена в искусственные липидные везикулы — **липосомы**, которые способны сливаться с плазматической мембраной и доставлять свое содержимое в цитозоль. Эффективность липосом-опосредуемого переноса может быть

повышена путем получения липосом на основе вирусных оболочек, которые часто содержат белки, способствующие слиянию с мембраной. Такие частицы называют **виросомами**. В отличие от липосом-опосредуемого переноса, **липофекция** включает образование ДНК-липидного комплекса (**липоплекса**), который захватывается в процессе эндоцитоза. Совсем недавно стали популярны переносчики генов, основанные на использовании катионных полимеров (**полиплексы**), поскольку использование специфических сополимеров дает возможность менять физические свойства вектора-переносчика. Как оказалось, в некоторых случаях можно сформировать комплексы, имеющие различные свойства при различных температурах, что позволяет контролировать высвобождение ДНК. Это особенно полезно при переносе генов *in vivo* к определенным участкам тела, которые можно соответствующим образом нагревать или охлаждать. В целом, доставка инкапсулированной ДНК гораздо менее эффективна, чем использование вирусных векторов, отчасти из-за того, что часть ДНК деградирует еще до достижения клеток-мишеней, но в основном из-за того, что большое количество введенной ДНК деградирует внутри клетки прежде, чем достигнет ядра. Кроме того, гораздо труднее направить невирусные переносчики на специфические клетки-мишени, хотя можно присоединить ДНК к другой молекуле, которая специфически связывается с рецепторами клеток определенных типов и стимулирует таким образом захват путем **рецептор-опосредуемого эндоцитоза**.

Как оказалось, можно вводить ДНК непосредственно в некоторые ткани *in vivo*. Например, инъекция растворов ДНК в мышечную ткань приводит к трансформации некоторых клеток, у которых экспрессия генов может происходить в течение многих месяцев. Для переноса ДНК к поверхности тканей существует альтернативный метод — **бомбардировка частицами**, при котором небольшие частицы металла покрывают ДНК и направляют с ускорением на ткань-мишень под действием высокого давления воздушного потока или электрического разряда.

Примеры лечения заболеваний

Было испытано более 500 протоколов генной терапии, более половины из которых предназначены для лечения рака (см. базы данных NIH по испытаниям генной терапии: www4.od.nih.gov/oba/rac/clinicaltrial.htm). Ниже мы рассмотрим ряд исследований, иллюстрирующих применение различных типов генной терапии, а также демонстрирующих связанные с этим возможные риски. Следует подчеркнуть, что генная терапия остается чрезвычайно рискованным подходом с непредсказуемым результатом.

Терапия добавления гена *in vivo*: муковисцидоз

Около 10% методов генной терапии предназначены для лечения редких заболеваний с менделевским типом наследования. Это связано с тем, что дефекты в одном гене могут корректироваться самым простым путем,

т. е. моногенной терапией. Муковисцидоз (кистозный фиброз, КФ) — самое распространенное менделевское (моногенное) заболевание среди представителей европеоидной расы, встречающееся 1 раз на каждые 2000 ла в мембране. Проявление болезни наблюдается в основном в дыхательной системе и поджелудочной железе, где дисбаланс ионов хлора вызывает появление густой слизи. В легких это вызывает затруднения в дыхании и способствует инфекциям, в то время как в поджелудочной железе слизь блокирует экскрецию пищеварительных ферментов, что приводит к нарушениям пищеварения. Введение функционирующего гена *CFTR* должно помочь ликвидировать эти эффекты.

Первоначальные испытания генной терапии КФ включали использование аденовирусных векторов, которые естественным образом инфицируют клетки верхних дыхательных путей. Векторы доставлялись с использованием аэрозольных ингаляторов, и у некоторых пациентов высокие дозы вектора вызывали воспалительные реакции (дополнение 8-2). Испытания, проведенные совсем недавно, включали более безопасные векторы, основанные на аденоассоциированных вирусах, или невирусную доставку генов липосомами. Несмотря на то что удалось осуществить перенос гена и была достигнута ограниченная экспрессия, результаты в целом оказались обескураживающими. Главная причина — в неспособности векторов-переносчиков генов проникать через слизь, покрывающую легкие больных КФ.

Терапия добавления гена *ex vivo*: тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID)

Первые испытания генной терапии начались в 1990 г. и проходили с участием четырехлетней девочки, страдающей **тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID)**. Болезнь характеризуется отсутствием функциональных лимфоцитов (В-клеток и Т-клеток), что приводит к полной неспособности бороться с инфекцией. Тяжелый комбинированный иммунодефицит может вызываться рядом дефектов, но в данном конкретном случае нефункциональным был ген *ADA*, кодирующий аденозиндезаминазу (ADA). Единственные традиционные методы лечения ADA-SCID предлагают пересадку костного мозга от подходящего донора или регулярные инъекции рекомбинантным ферментом ADA. В отсутствие такого лечения больные дети вынуждены жить в (искусственных) стерильных условиях — «дети под колпаком».

Дефицит ADA был идеальным первым объектом для испытаний методов генной терапии по следующим причинам:

- Патологическое действие болезни обратимо.
- Болезнь — результат потери функции одного гена.
- Уровень ADA широко варьирует в нормальных популяциях, так что жесткий контроль введенного гена не очень важен.

Ген *ADA* очень маленький, его легко перестраивать в лабораторных условиях.

- Клетки-мишени для терапии — лимфоциты, они доступны, легко культивируются и могут быть легко возвращены в организм пациента.

- Альтернативные методы лечения очень дорогостоящи и/или опасны.

Функциональный ген *ADA* был введен в ретровирусный вектор и использовался для трансдукции культивированных Т-лимфоцитов, которые в дальнейшем были введены обратно в организм пациента. Хотя испытания на тот момент были признаны успешными, эффект от лечения оказался кратковременным, и пациент в настоящее время продолжает лечение препаратами фермента ADA. Была начата следующая серия испытаний. В качестве мишеней были использованы клетки костного мозга или клетки крови из пупочного канатика, поскольку эти популяции содержат стволовые клетки, продуцирующие лимфоциты на протяжении всей жизни. Модификация этих стволовых клеток приводила к долговременной продукции небольшого числа ADA-положительных лимфоцитов, но уровни ADA, производимые этими клетками, были очень низкими. Более того, в течение всего периода испытаний клеток продолжалась терапия ферментом ADA, и пока неясно, выжили бы пациенты без этой терапии.

В 2002 г. произошел значительный прорыв в области генной терапии ADA-SCID, явившийся результатом использования метода, называемого **немиелоаблативным кондиционированием**, при котором костный мозг больного SCID частично убивают, чтобы дать возможность модифицированным стволовым клеткам размножаться (рис. 8-5). Другим важным фактором было то, что никого из детей, участвующих в испытаниях, не лечили ферментом ADA. Возможно, отсутствие успеха в предыдущих испытаниях генной терапии могло быть связано с лечением ферментом. Первым пациентом была двухлетняя девочка из Палестины, которая никогда не проходила терапии ADA. Новый метод лечения, судя по всему, до сих пор оказывает благотворное действие на ее состояние, и теперь она живет дома с родителями, а в ее организме вырабатываются антитела, как и у

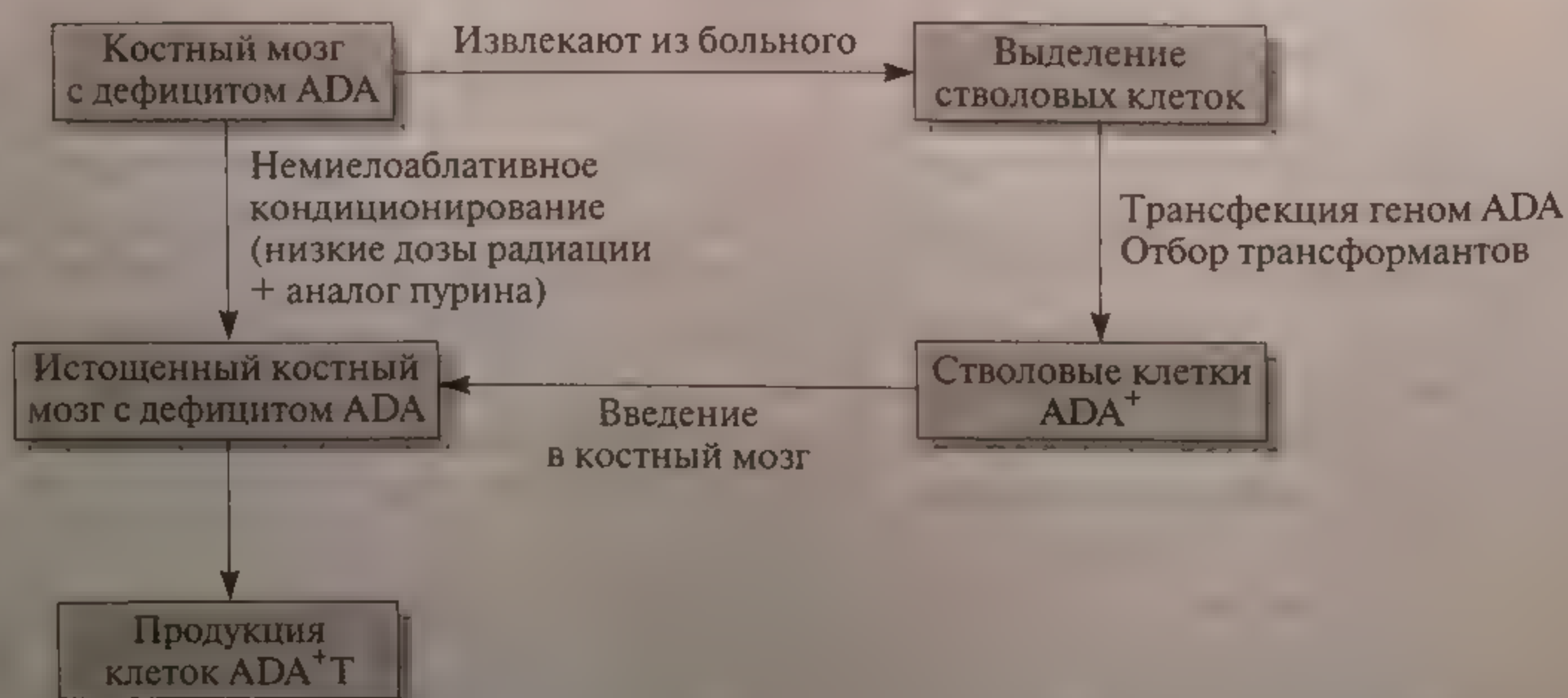


Рис. 8-5 Общая схема генной терапии ADA-SCID с помощью немиелоаблативного кондиционирования.

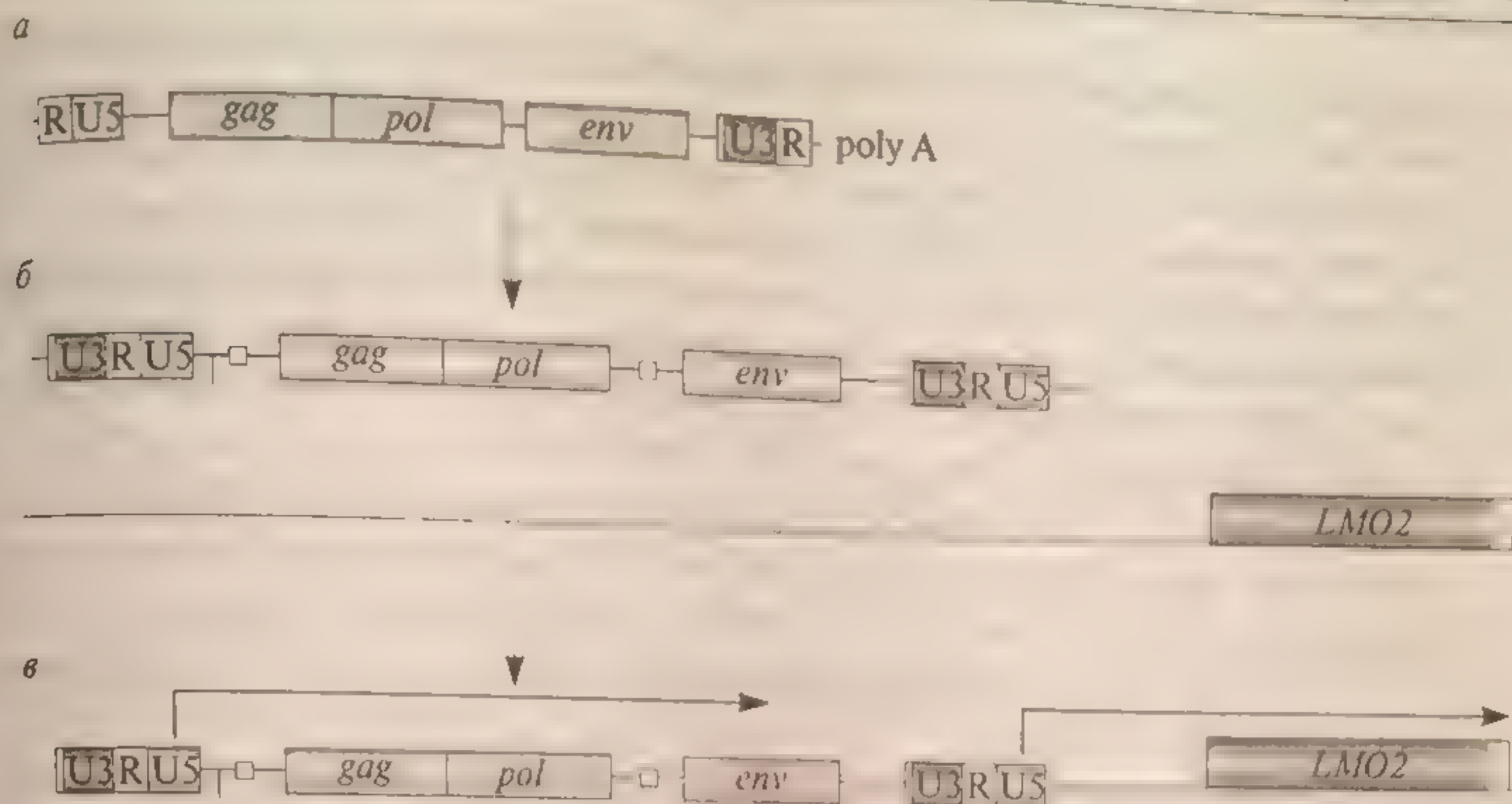


Рис. 8-6 Возможный механизм возникновения лейкемии у пациентов в результате генной терапии с применением рекомбинантных ретровирусов. *a* — типичная структура ретровируса: гены *gag*, *pol* и *env* кодируют ферменты, необходимые для репликации, а также компоненты вирусной оболочки; *б* — в векторе для генной терапии все вирусные гены deletированы и заменены фрагментом ДНК человека, но последовательности, необходимые для интеграции в геном и экспрессии, сохранены. Часть цикла репликации вируса включает копирование концов генома для создания длинных концевых повторов (LTR). Во время этого процесса происходит дупликация промотора LTR; *в* — дуплицированный промотор способен активировать прилегающие гены. У двух пациентов клоны Т-клеток, в которых вектор интегрировался рядом с онкогеном *LMO2*, начали размножаться с аномальной скоростью, что привело к лейкемии.

других детей. Девочка заболела ветряной оспой и выздоровела, хотя еще за несколько месяцев до этого безусловно погибла бы.

Генная терапия использовалась также для лечения родственной болезни (Х-сцепленного SCID), которая вызывается потерей гамма-цепи рецептора интерлейкина-2. Как и в случае ADA-SCID, был реализован подход *ex vivo*, при котором ретровирусный вектор, содержащий полноценную копию поврежденного гена *IL2RG*, был использован для трансдукции культивированных гематopoэтических стволовых клеток впоследствии снова введенных в организм пациента. Девять из 11 подвергнувшихся лечению пациентов, судя по всему, излечились. Но с момента начала испытаний два из них заболели лейкемией, которая, по-видимому, была вызвана активацией онкогена, прилегающего к месту интеграции ретровируса (рис. 8-6). По этой причине испытания генной терапии, включающие ретровирусную трансдукцию, были приостановлены до получения новых данных о состоянии этих пациентов.

Терапия добавления и ингибирования генов *in vivo*: рак

Рак — приобретенное генетическое заболевание — характеризуется избыточной пролиферацией клеток (см. гл. 5). Генная терапия разрабатывается в качестве важной альтернативы обычным методам лечения (радио-

терапии, химиотерапии и биотерапии), и более половины всех опробованных протоколов генной терапии предназначены для лечения рака. Стандартная терапия добавления гена, как это обсуждалось в двух предыдущих случаях, может быть использована для замены утраченных генов опухолевых супрессоров с целью восстановить нормальный контроль над клеточным циклом. Однако большинство подходов к лечению рака включают либо ингибирование онкогенов, либо уничтожение раковых клеток. Существует множество различных стратегий.

На ранних стадиях испытаний генной терапии рака сами опухолевые клетки не использовались в качестве терапевтической мишени. Вместо этого инфильтрирующие опухоль лимфоциты трансформировали с добавочной копией гена фактора некроза опухоли, что делало их еще более эффективными убийцами. Это расширение адаптивной биотерапии, рассмотренной на с. 164, при которой Т-клетки стимулируются *ex vivo* под действием интерлейкина 2.

Использование ретровирусов в качестве векторов для генной терапии *in vivo* дает большие преимущества, поскольку эти вирусы могут инфицировать пролиферирующие клетки и, таким образом, являются селективными по отношению к опухолевой ткани. В связи с этим был разработан ряд методов генной терапии, в которых мишенями служили опухолевые клетки. Например, широко используемый метод — введение антиген-продуцирующих генов, которые делают раковые клетки более подверженными атаке со стороны иммунной системы. В то же время, если известен

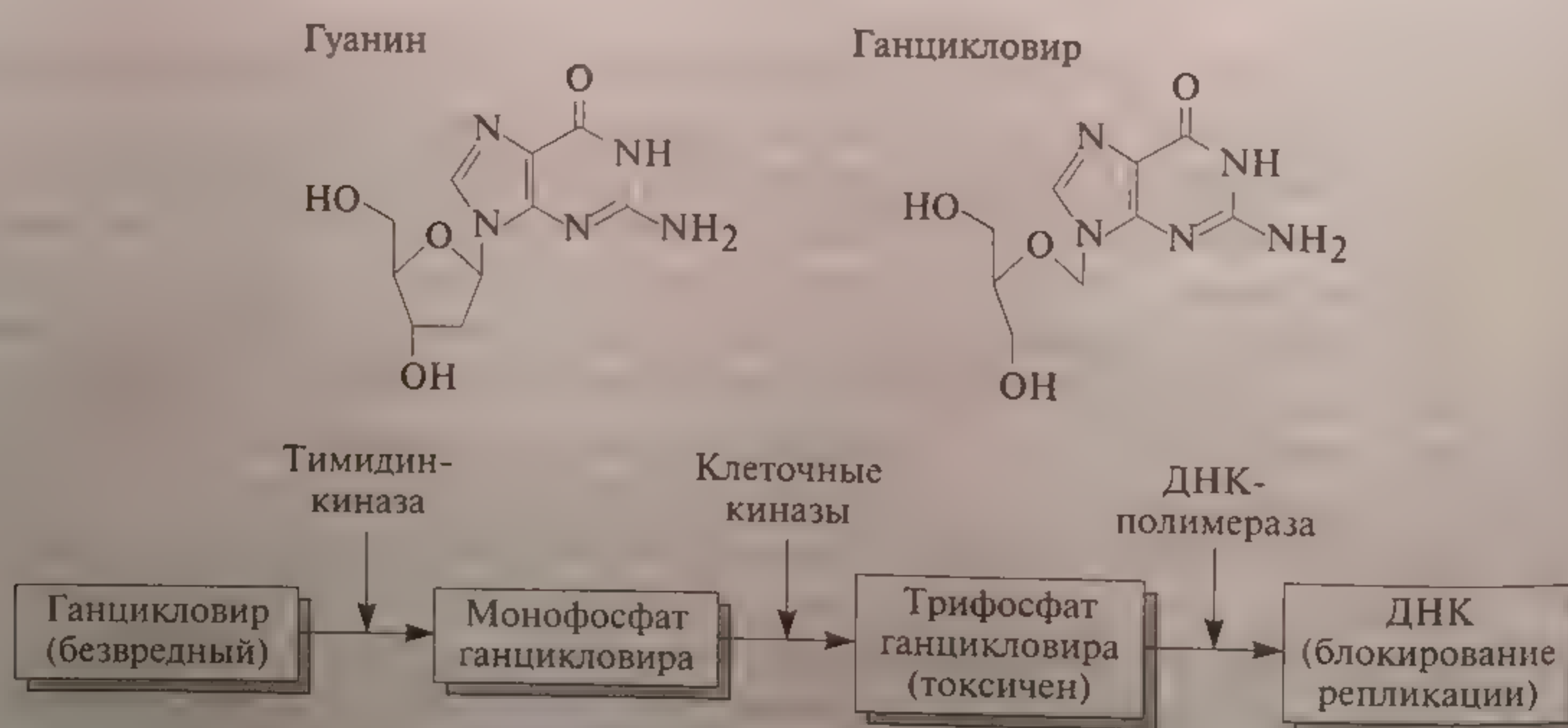


Рис. 8-7 Активность ганцикловира. Безвредное пролекарство, аналог нуклеозида гуанозина, фосфорилируется ферментом тимидинкиназой, ген которой может быть введен в раковые клетки в качестве гена «самоубийства». В результате действия клеточных киназ образуется трифосфат указанного аналога, который может включаться в ДНК. Содержащая ганцикловир ДНК менее стабильна, чем нормальная ДНК, и это вызывает остановку ДНК-полимеразного комплекса, что приводит к блокированию репликативной вилки до тех пор, пока не произойдет репарация ДНК. Если репарация невозможна (как в случае присутствия избытка ганцикловира), клетки подвергаются апоптозу.

специфический онкоген, участвующий в развитии рака, то может быть разработан подход, при котором мишенью служит продукт этого гена. Однако большинство подходов к генной терапии рака включает направленное уничтожение клеток путем введения генов «самоубийства», которые превращают нетоксическое пролекарство в токсическое производное. Примером служит ген тимидинкиназы из вируса простого герпеса, которая превращает безвредное пролекарство ганцикловир в нуклеотидный аналог, способный включаться в ДНК и блокировать репликацию путем ингибирования ДНК-полимеразы (рис. 8-7).

Лекарства на основе нуклеиновых кислот

Генная терапия подразумевает введение функциональных генов в клетки человека. Принцип состоит в том, что эти гены, будучи интегрированы в хромосому или находясь в составе эписом, экспрессируются, и продукт гена либо компенсирует первоначальный дефект, либо противодействует ему. Другой подход предполагает использование нуклеиновых кислот в качестве лекарств. В этом случае нуклеиновая кислота выступает не в роли экспрессирующегося гена, а в виде экзогенно вводимой молекулы, которая захватывается клетками и предназначена для того, чтобы препятствовать экспрессии или активности эндогенного гена на уровне ДНК, РНК или белка (табл. 8-1). Введение этих лекарств осуществляется с использованием рассмотренных ранее невирусных методов переноса генов. Однако в отличие от генной терапии, лекарственное действие нуклеиновых кислот, как ожидается, не будет долговременным. Они могут помочь излечиться от инфекционных болезней или рака, но являются лишь средством симптоматического лечения в случае наследственных заболеваний.

Таблица 8-1 Нуклеиновые кислоты, используемые для подавления экспрессии эндогенного гена, и механизмы их действия

Подход	Мишень	Эффект
Антисмысловые олигонуклеотиды (ДНК, РНК или синтетические производные)	Ген или мРНК	Образование триплекса, ингибирование транскрипции Образование дуплекса, ингибирование трансляции, стимулирование деградации
Рибозим	мРНК	Каталитическая деградация мРНК
Максизим	мРНК	Каталитическая деградация мРНК с аллостерической модуляцией
Двухцепочечная РНК	мРНК	Каталитическая деградация мРНК
Короткая интерферирующая РНК	мРНК	Каталитическая деградация мРНК
Олигонуклеотидный аптамер	Белок	Ингибирование белковой активности

Антисмысловые препараты

Антисмысловые (антисенс) препараты — это короткие олигонуклеотиды (обычно длиной 12–25 нуклеотидов), содержащие последовательность, комплементарную кодирующей цепи гена-мишени. Они могут ингибировать экспрессию поврежденного гена двумя путями. Первый путь включает взаимодействие антисмысловых олигонуклеотидов с ДНК с образованием стабильного триплекса, предотвращающего транскрипцию. Второй путь включает взаимодействие с мРНК с образованием стабильного дуплекса, что ингибирует синтез белка, а также приводит к селективной деградации мРНК-мишени ферментом РНазой Н. Последняя узнает двухцепочечные нуклеиновые кислоты и разрушает входящую в их состав РНК. В случае дуплексов РНК-РНК деградации подвергаются обе цепи, а в случае дуплексов ДНК-РНК разрушается только РНК-цепь. Следовательно, ДНК-олигонуклеотиды более эффективные терапевтические агенты, так как они могут последовательно взаимодействовать с множеством транскриптов. Несмотря на то что ДНК- и РНК-олигонуклеотиды удобно синтезировать, они подвержены деградации клеточными нуклеазами. Поэтому в настоящее время антисмысловые лекарства представляют собой структурные производные природных нуклеиновых кислот (например, ДНК с модифицированными фосфотиоатными связями) или синтетические аналоги олигонуклеотидов, содержащие химические связи, устойчивые к клеточным нуклеазам (например, пептидные нуклеиновые кислоты, в которых основания прикреплены к синтетическому пептидному остову, и аналогичные соединения с найлоновым или карбазатным остовом). Вообще же, действие любого антисмыслового олигонуклеотида непредсказуемо и должно устанавливаться эмпирически. При использовании синтетических молекул может также проявляться неспецифический токсический эффект. Чрезвычайно эффективны устойчивые к действию нуклеаз морфолино-олигонуклеотиды (производные олигорибонуклеотидов), которые решают многие из указанных проблем. Первое одобренное антисмысловое лекарство фомивирсен (витравен) — ДНК-олигонуклеотид с фосфотиоатными связями, который используется для лечения цитомегаловирусных инфекций.

Лекарства на основе рибозимов

Рибозимы — это каталитические молекулы РНК, т. е. молекулы РНК, обладающие теми же функциональными свойствами, что и ферменты белковой природы. Максизимы — модифицированные рибозимы, активность которых можно контролировать с помощью малых регуляторных молекул. Природная функция многих рибозимов — катализ расщепления других молекул РНК, и эту активность можно направить на транскрипты, получаемые со специфических поврежденных генов, путем введения антисмысловой последовательности в конструкцию, содержащую рибозим

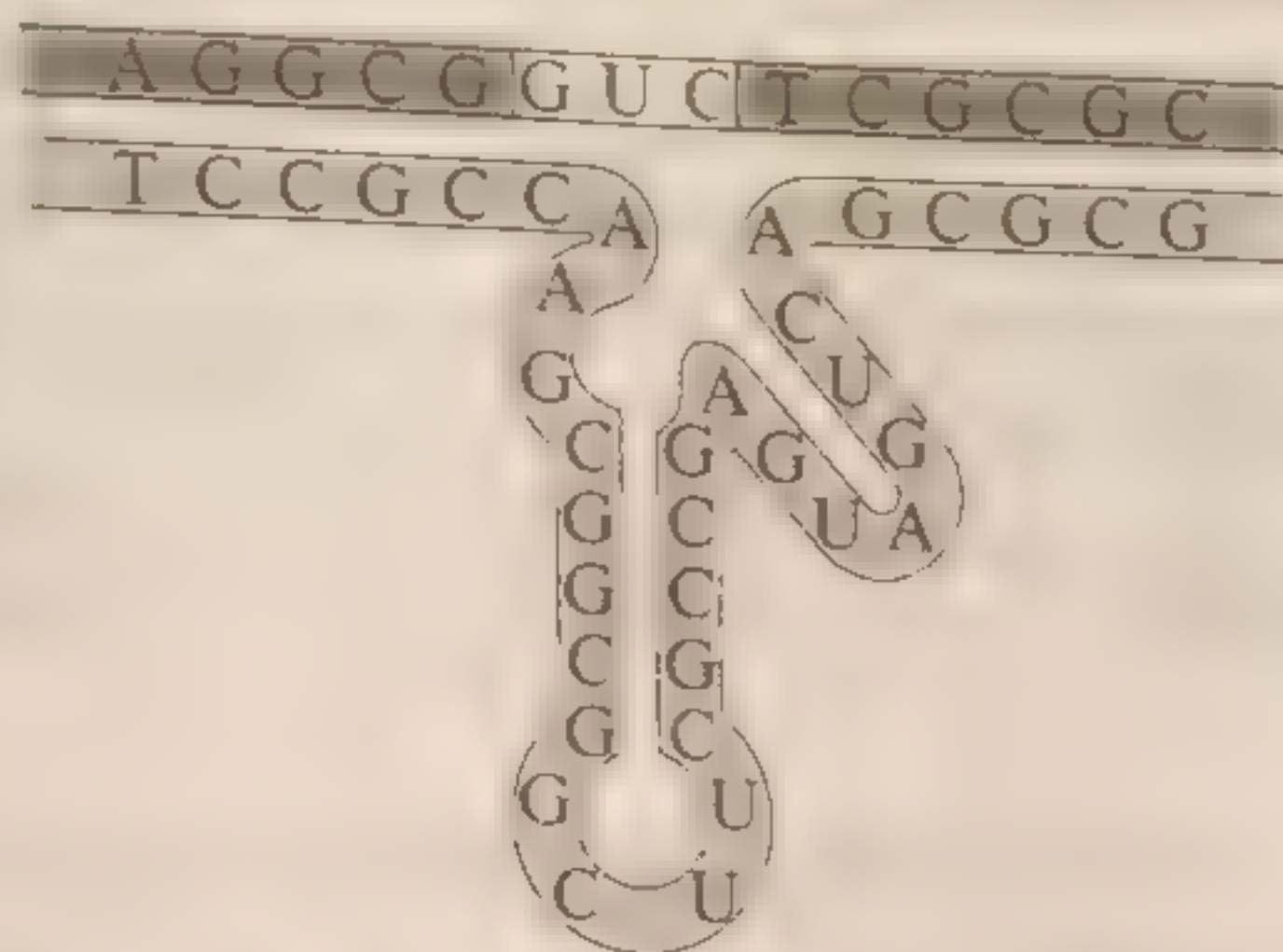


Рис. 8-8 Структура рибозима. Верхняя последовательность (на темном поле) — мРНК-мишень. Нижняя последовательность (на более светлом поле) — антисенс-РНК, в которую встроен каталитический компонент рибозима. Рибозим расщепляет последовательность GUC (на белом поле), что приводит к последующей деградации мРНК.

(рис. 8-8). Антисмысловые последовательности позволяют рибозиму или максизиму связаться с мРНК-мишенью в результате комплементарных взаимодействий; транскрипт расщепляется, а затем быстро деградирует. Поскольку рибозимы обладают каталитическими функциями, они потенциально могут расщепить много копий транскрипта-мишени до того, как сами подвергнутся деградации. Исследования сфокусированы на использовании рибозимов со структурой, напоминающей «головку молотка», которые могут включаться в антисмысловую конструкцию путем рекомбинации. Лекарство-рибозим Herzyme, который расщепляет мРНК эпидермального фактора роста 2, обсуждается в дополнении 4-1.

Возможности малых интерферирующих РНК

РНК-интерференция (RNAi) представляет собой клеточный защитный механизм, обнаруженный у червя нематоды *Caenorhabditis elegans*, при котором дцРНК (dsRNA) может индуцировать сильное и очень специфическое подавление (silencing, «сайленсинг») экспрессии гомологичного гена. Механизм, по-видимому, появился в процессе эволюции для защиты клеток от вирусов и включает расщепление дцРНК нуклеазой, называемой Dicer, на фрагменты длиной 21–25 п. н, известные как **короткие интерферирующие РНК (киРНК, siRNA)**, которые в дальнейшем превращаются в одноцепочечные фрагменты. Эти одноцепочечные фрагменты связываются с белками с образованием **РНК-индуцированного «сайленсингового» комплекса (RISC)**, который узнает комплементарные мРНК и очень эффективно их расщепляет (рис. 8-9). Обычная RNAi (РНК-интерференция) не работает в клетках человека, поскольку количество эндонуклеазы Dicer ограничено, а длинные молекулы дцРНК вызывают неспецифический интерфероподобный ответ на вирусы. Однако киРНК могут быть синтезированы химическим путем и введены в клетки (или экспрессироваться внутри них в виде «шпионских» генов), что должно способствовать образованию RISC и очень специфическому эффекту подавления. Хотя в настоящее время нет лекарств на

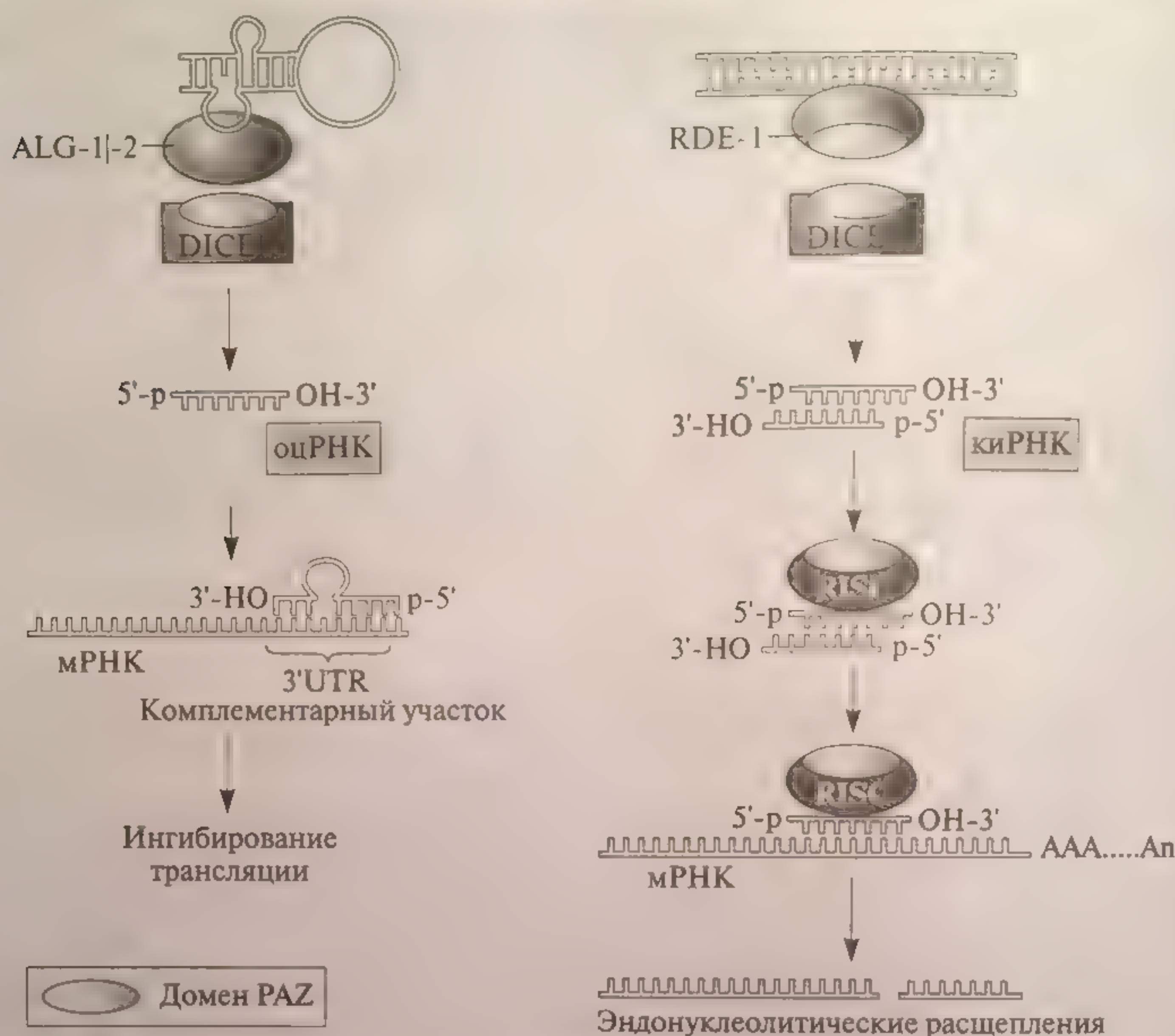


Рис. 8-9 Механизм РНК-интерференции. Двухцепочечная РНК узнается белковым комплексом, который взаимодействует с эндонуклеазой DICER. Если дцРНК (dsRNA) несовершенна и содержит петли и неспаренные участки, она расщепляется нуклеазой DICER на короткие одноцепочечные молекулы, способные связываться с мРНК и стехиометрически препятствовать трансляции. В то же время совершенные дуплексы расщепляются с образованием коротких двухцепочечных молекул с короткими выступающими одноцепочечными концами. Их называют короткими интерферирующими РНК (киРНК, siRNAs). Они взаимодействуют с белками с образованием РНК-индуцированного «сайленсингового» комплекса (RISC). RISC каталитически расщепляет мРНК, содержащую комплементарную последовательность. Эффект «сайленсинга» (подавления экспрессии) чрезвычайно мощный и долговременный. Существует некоторое сходство между двумя приведенными схемами.

основе RNAi, метод нашел применение для инактивации генов и функционального тестирования в клетках человека (см. ниже) и он обязательно будет востребован в терапии.

Аптамеры

Рассмотренные выше лекарства на основе нуклеиновых кислот взаимодействуют с транскриптом гена-мишени, в результате чего функциональный белок отсутствует. Однако нуклеиновые кислоты могут также с большой специфичностью взаимодействовать с белками, что обеспечива-

ет другую возможность для терапевтического вмешательства. Олигонуклеотиды, взаимодействующие с белками, называются аптамерами и могут быть введены в клетку обычными методами трансфекции. Пример терапевтического использования аптамеров — прерывание циклов размножения вирусов аптамерами, которые прочно связываются с субъединицами белка вирусной оболочки, что предотвращает их сборку.

Генная терапия инфекционных заболеваний: ВИЧ

В методах генной терапии и использовании лекарств на основе нуклеиновых кислот много общего, поскольку олигонуклеотиды, которые вводятся непосредственно в клетку, можно также получать в результате экспрессии трансгенов. Терапевтические подходы, базирующиеся на экспрессии антисмысловых РНК, рибозимных конструкций, коротких интерферирующих РНК, **интрамеров** (РНК-аптамеры, экспрессирующиеся внутри клеток для белковой интерференции) и **интраантител** (антитела, экспрессируемые внутри клеток для белковой интерференции), были использованы в борьбе с ВИЧ-инфекцией и СПИДом (рис. 8-10).

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) — наиболее опасный для человека вирусный патоген, и поэтому огромные денежные средства из различных фондов направляются на исследования, связанные с разработкой новых терапевтических подходов к предотвращению и лечению этого заболевания. Поскольку ВИЧ является ретровирусом, то в качестве мишени при



Рис. 8-10 Стадии инфицирования ВИЧ и примеры возможных путей вмешательства с использованием генной терапии или других методов генной медицины.

проведении терапии можно использовать геномную РНК или вирусные белки. ВИЧ специфически инфицирует Т-лимфоциты, что делает генную терапию *ex vivo* наиболее эффективным подходом. Тем не менее разрабатываются также лекарства на основе нуклеиновых кислот, которые действуют на Т-лимфоциты *in vivo*. Были получены антисмысловые олигонуклеотиды, которые узнают гены *pol* и *env*, кодирующие вирусную обратную транскриптазу (необходимую для репликации) и белки оболочки (важные для взаимодействия с рецепторами Т-клеток). Т-клетки были также трансформированы конструкциями, экспрессирующими антисмысловую РНК, направленную на подавление экспрессии этих генов, а также генов регуляторных белков Tat и Rev. Были созданы рибозимы, расщепляющие геном ВИЧ, которые были введены в Т-клетки в составе ретровирусных конструкций. В процессе нормального инфекционного цикла белки Tat и Rev связываются с регуляторными последовательностями в геноме, известными как *TAR* и *RRE*. Новый подход к ингибированию ВИЧ-инфекции предполагает высокоэффективную экспрессию РНК-ловушек, несущих множество копий этих последовательностей. Основная идея заключается в том, что такие РНК свяжут все белки Tat и Rev и таким образом ограничат их доступность для вируса. Для блокирования сборки вирионов ВИЧ были получены как аптамеры, так и антитела; кроме того, интраантитела были экспрессированы в Т-клетках для ингибирования белков Tat и Rev и блокирования сборки субъединиц белка оболочки gp160. Альтернативный подход к блокированию сборки вириона — суперэкспрессия мутантной формы вирусного белка, которая препятствует функции других белков (**доминантно-негативный** подход). Например, модифицированный белок Rev, который не может образовывать комплексы, предотвращает экспорт РНК ВИЧ из ядра инфицированных Т-клеток. Как и в случае генной терапии рака, были разработаны новые подходы, имеющие целью сделать Т-клетки более мощными убийцами ВИЧ-инфицированных клеток.

ДНК-вакцины

Обычная вакцинация включает предоставление антигенов иммунной системе путем введения всего организма (убитого или аттенуированного патогена) или его компонентов, полученных методами рекомбинантных ДНК. **ДНК-вакцинация** — другой метод генной медицины, где вакцинируемым вводится ДНК. Это не приводит к иммунному ответу на молекулы ДНК, но если ДНК экспрессируется, то образуется белок, который может стимулировать выработку иммунной системой соответствующих антител (рис. 8-11). Таким образом, ДНК-вакцинация очень напоминает генную терапию (тем, что введенная ДНК экспрессируется), но вместо прямого воздействия на болезнь лечение или предупреждение осуществляется путем активации иммунной системы. Преимущества такого метода заключаются в его простоте (используются стандартные методы клонирования), а также в том, что практически одинаковые приемы могут быть

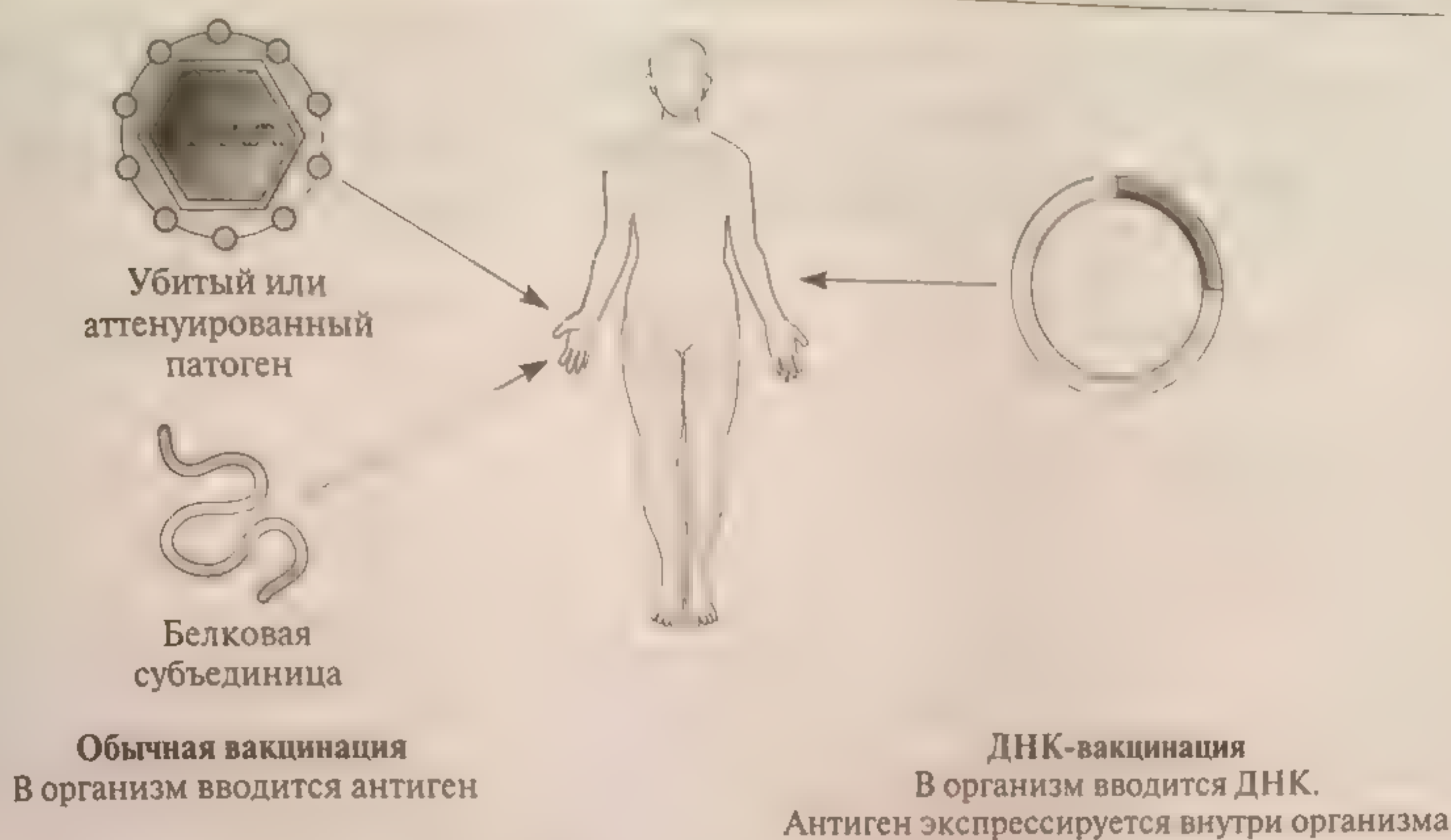


Рис. 8-11 Сравнение обычной вакцинации и ДНК-вакцинации.

использованы для вакцинации против любой болезни. Кроме того, с учетом ведущихся в настоящее время работ по секвенированию геномов большого количества микробных патогенов ДНК-вакцинация обеспечивает быстрый путь выявления новых мишеней вакцин путем высокопроизводительного тестирования на мышах. ДНК может вводиться путем инъекций с использованием липосом или бомбардировкой частицами. Первая демонстрация метода — долгосрочная защита от гриппа, а в настоящее время проходят испытания более 40 ДНК-вакцин против таких болезней, как корь, ВИЧ, лихорадка Эбола и туберкулез. ДНК-вакцинация также изучается в качестве средства защиты от прионных болезней.

Модели болезней

Обсужденные выше методы переноса генов — трансфекция, прямой перенос и вирусная трансдукция — применимы как к животным, так и к человеческому организму. В то время как перенос генов в человеческий организм используется для предотвращения и лечения болезней, в случае животных зачастую основная цель — **вызывать болезнь**, что позволяет создавать модели болезней, которые можно использовать для исследования последних на молекулярном уровне и тестировать новые лекарства. Культуры клеток и экспериментальные животные используются для изучения болезней уже много лет, но ранее соответствующие модели получали только случайным мутагенезом. Технология переноса генов в настоящее время позволяет вводить специфические последовательности ДНК в геном клеток животных или точно и необходимым образом модифицировать имеющийся геном. Поэтому мутации можно планировать и вводить в конкретные гены для точной имитации

человеческих болезней. Наиболее подходящим модельным организмом для большинства человеческих болезней является мышь, хотя крыса, полосатый данио и даже более примитивные животные, такие как мухи и черви, также пригодны для моделирования некоторых болезней (табл. 8-2).

Таблица 8-2 Животные и микроорганизмы, используемые для моделирования болезней человека

Организм	Свойства
Мышь	Стандартная модель для изучения болезней. Геномы мыши и человека были картированы и секвенированы. Для них характерна широкая синтенция (консервативность расположения генов), поэтому легко идентифицировать ортологи генов, что позволяет выявлять подлинно гомологичные болезни. Был проведен широкомасштабный скрининг мутантов, и специфические мутанты могут быть легко картированы с использованием межвидового обратного скрещивания. Технология нокаута генов позволяет вводить любые заранее определенные мутации в любой ген (см. TBASE, базу данных транс-генов/направленных мутаций: http://www.gbd.org/Dan/tbase.html)
Крыса	Крысы пригодны для изучения некоторых сложных болезней, для которых не существует мышиных моделей (например, некоторые нарушения в поведении). Они в большей степени подходят для физиологических и фармакологических исследований
Полосатый данио	Хорошая модель для изучения позвоночных, генетическое сходство, крепкие прозрачные эмбрионы. Фенотипическое проявление мутаций, идентифицированных при генетическом скрининге полосатого данио, напоминают человеческие болезни; особенно удобные модели существуют для гематопозитических и сердечно-сосудистых заболеваний
Беспозвоночные	Беспозвоночные модельные организмы <i>Drosophila melanogaster</i> и <i>Caenorhabditis elegans</i> позволяют создавать удобные модели определенных болезней путем воздействия на высококонсервативные пути, такие как инсулиновый сигнальный путь (<i>C. elegans</i> , модель диабета) и передача сигнала фактора роста (<i>D. Melanogaster</i> , модель рака). Пригодны для высокопроизводительного анализа, модели на основе <i>C. elegans</i> очень удобны для изучения инактивации генов РНК-интерференцией (см. гл. 2)
Микроорганизмы	Дрожжи и бактерии позволяют создавать модели болезней, связанных с нарушениями чрезвычайно консервативных молекулярных процессов, включая клеточный цикл (на основе дрожжей созданы модели рака и синдрома Вернера) и репарацию ДНК (на основе <i>E. coli</i> — модель нестабильности генома при некоторых формах рака; см. гл. 5)

Модели моногенных болезней

Многие человеческие болезни являются результатом утраты функции единственного гена, и подходящие модели можно создавать путем инактивации соответствующего гена (ортолога) в другом организме. Использование организма мыши для реализации такого подхода имеет множество преимуществ, главное из которых (биотехнологическое) — возможность провести эксперименты по **нокауту генов**, когда один-единственный ген инактивируется в результате мутации (дополнение 8-3). Таким путем

были созданы многие полезные мышинные модели болезней, включая синдром Леш—Нихана (дефицит гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы, HPRT), кистозный фиброз, β -талассемию и синдром слабой Х-аналогичных подходов был достигнут эффект утраты функции генов (табл. 8-1). Например, мышинная модель диабета была получена путем специфической экспрессии рибозима, направленного против мРНК глюкокиназы в β -клетках поджелудочной железы, а модели нескольких болезней на базе полосатого данно были получены с использованием антисмысловых морфолино-олигонуклеотидов. По мере модернизации таких подходов появляется много общего между созданием моделей болезней и методами функциональной геномики (см. гл. 2) — широкомасштабным мутагенезом и скринингом путем интерференции.

Болезни, вызываемые доминантными мутациями, приводящими к приобретению функции, могут быть моделированы просто переносом гена с эквивалентной мутацией в геном мыши с помощью обычных технологий переноса генов (дополнение 8-3). Например, мышинные модели болезни Альцгеймера были получены суперэкспрессией гена белка-предшественника амилоида, а модель синдрома Вернера (преждевременного старения) — путем экспрессии доминантно-негативного мутанта гена *WRN*. Были получены мышинные модели, удобные для изучения болезней триплетных повторов, например спинномозжечковой атаксии 1 типа, вызываемой экспансией микросателлитных повторов внутри генов (см. с. 123). Один из первых примеров моделирования болезни, связанной с приобретением функции, — экспрессия в мышцах мутантной формы прионного белка, моделирующая нейродегенеративный синдром Гершмана—Штресслера—Шейнкера (GSS). Однако для моделирования человеческих болезней на мышах имеются определенные ограничения, что связано с биологическими и генетическими различиями между мышами и людьми. Например, недавно завершенное секвенирование генома мыши показало, что в нем нет ортологов для некоторых человеческих генов. Кроме того, лабораторные мыши представляют собой в основном инбредные популяции, а человек — аутбредные, так что различия в генетических особенностях, по-видимому, оказывают наибольший эффект (см. гл. 4). Все это вместе обуславливает биохимические и физиологические различия, которые иногда приводят к совершенно разным фенотипическим проявлениям заболеваний. В качестве примера можно привести болезнь Тэя—Сакса, которая вызывается потерей функции гена *HEXA*, кодирующего гексозаминидазу А. Это приводит к накоплению в нейронах мозга гликолипидных молекул, известных как ганглиозиды GM2, что в свою очередь ведет к прогрессирующей нейродегенерации и, в конце концов, к смерти. Болезнь Тэя—Сакса может быть моделирована на мышах путем инактивации соответствующего гена *Hexa*, но при этом, хотя и происходит накопление ганглиозидов GM2, не наблюдается характерных для заболевания человека симптомов: трудностей с обучением и утраты моторных функций.

Дополнение 8-3 Перенос генов мышам

Введение ДНК в одну клетку — достаточно простая процедура. Однако гораздо более сложная задача обеспечить введение той же ДНК во все клетки, чтобы создать модель человеческой болезни у мышей. Для этого необходимо найти путь введения ДНК в зародышевые клетки мышей, чтобы получались генетически модифицированные гаметы. По сути это эквивалент зародышевой генной терапии у людей, осуществленный на животных. Любые животные, получаемые в результате оплодотворения этими гаметами, будут иметь одну и ту же дополнительную ДНК-последовательность в каждой клетке. Таких животных называют трансгенными.

В настоящее время существует несколько различных подходов к трансформации зародышей мышей:

- Трансфекция начальных зародышевых клеток (клетки, дающие начало гаметам)

- Прикрепление ДНК к головке сперматозоида таким образом, что она водится в яйцеклетку при оплодотворении

- Микроинъекция ДНК в мужской пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки

- Инфицирование мышиногo эмбриона рекомбинантным ретровирусом

- Трансфекция эмбриональных стволовых клеток (ES), которые могут колонизировать эмбрион

Наиболее широко используемые методы — пронуклеарная инъекция и трансфекция ES-клеток.

Процедура пронуклеарной микроинъекции проста. ДНК втягивают в тонкую иглу и впрыскивают в мужской пронуклеус недавно оплодотворенной клетки. ДНК встраивается в геном (обычно много копий), и потомство мыши с высокой частотой становится трансгенным. Иногда после нескольких раундов клеточного деления ДНК интегрирует, и мышь становится

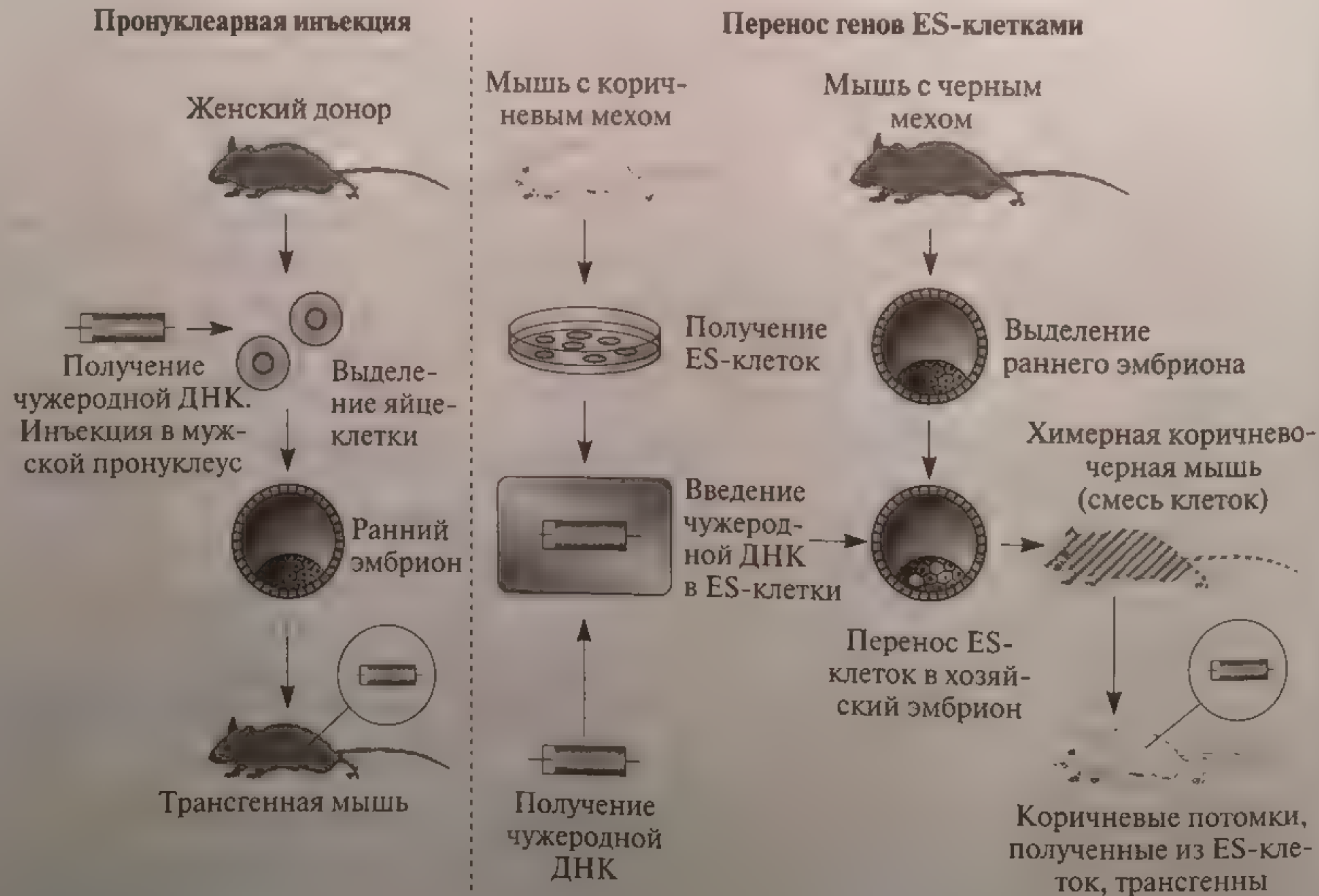


Рис. Д8-3а Процедура создания трансгенных мышей путем пронуклеарной микроинъекции и переноса генов с помощью ES-клеток.

химерной (трансгенными становятся только некоторые клетки). Однако если среди трансформированных клеток есть клетки зародышевой линии, то следующее поколение мышей будет полностью трансгенным (рис. Д8-3а).

Эмбриональные стволовые клетки — это культивированные клетки, полученные из мышиной бластоцисты. Если их ввести путем инъекции в хозяйскую бластоцисту, они колонизируют эмбрион и дают начало другим тканям, включая зародыши. Преимущество ES-клеток состоит в том, что перенос гена осуществляется в культуре, так что для идентифика-

ции клеток с нужной генетической модификацией можно использовать методы селекции. Однако важнейшее достоинство ES-клеток в том, что они склонны к рекомбинации. Это означает, что они могут быть использованы для направленного изменения гена-мишени. В таком случае введенная ДНК не встраивается случайным образом, а подвергается гомологичной рекомбинации с родственным геном в геноме и замещает его. Это лежит в основе метода получения нокаутных мышей, который используется для создания моделей болезней, связанных с утратой функции гена (рис. Д8-3б).

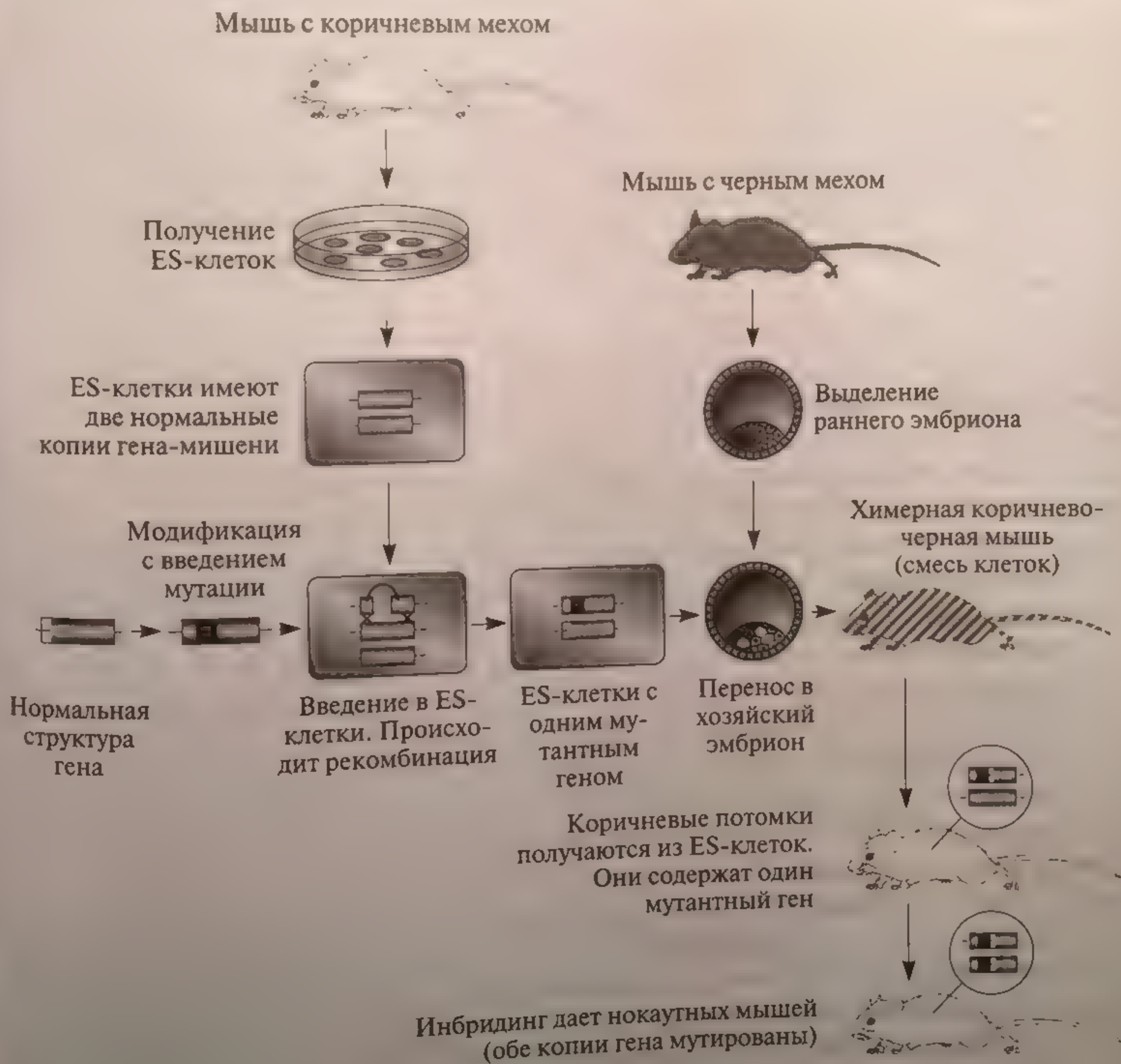


Рис. Д8-3б Процедура создания мышей с нокаутом гена.

Модели комплексных болезней

Расшифровка последовательности генома человека позволила идентифицировать гены, связанные с рядом комплексных болезней (болезни, возникающие под действием множества генетических и внешних факторов, которые не характеризуются простыми паттернами наследования). Моделировать комплексные болезни сложнее всего, но некоторые успехи были достигнуты в экспериментах, когда скрещивали линии мутантных мышей с целью накопления нескольких мутаций в одном организме. Например, потомки, полученные от скрещивания *волнистых* (undulated) и *пятнистых* (Patch) мышей, привели к созданию хорошей модели врожденного дефекта расщелины позвоночника без спинномозговой грыжи. В других случаях подобного рода скрещивания открыли путь к новым методам терапии. Например, трансгенные мыши, суперэкспрессирующие человеческий β -глобин и мутантную форму β -глобина человека, которая стимулирует полимеризацию, обеспечивают хорошие модели для серповидноклеточной анемии. Однако когда этих мышей скрещивают с мышами, экспрессирующими человеческий зародышевый гемоглобин в период полового созревания, то у результирующих трансгенных гибридов обнаруживается поразительное уменьшение симптомов болезни. Это дает основания предполагать, что генная терапия с использованием зародышевого гемоглобина способна помочь в борьбе с серповидноклеточной анемией у человека.

Клеточная терапия

Клеточная терапия основана на использовании клеток в качестве терапевтических агентов. В этой главе мы коротко рассмотрим принципы клеточной терапии, поскольку во многих случаях терапевтический потенциал клеток включает генетическую модификацию или другие виды оздоровления *ex vivo*. Однако это не всегда так. Сами клетки могут выступать в роли терапевтического агента, особенно если используются для замены поврежденных или старых клеток у больного (типичный пример клеточной терапии — пересадка кожи при лечении ожогов). Большие ожидания от клеточной терапии связаны в настоящее время в основном с возможным использованием **стволовых клеток**, которые самовоспроизводятся и поэтому открывают перспективы получения неограниченного числа здоровых клеток, вызывая длительный терапевтический эффект.

Различают два типа стволовых клеток: эмбриональные стволовые клетки (ES) и взрослые. **Эмбриональные стволовые клетки** получают из человеческого эмбриона на ранней стадии развития, и они обладают способностью давать начало клеткам всех типов в организме (это свойство называется **плюрипотентностью**). Использование мышиных ES-клеток обсуждается в дополнении 8-3. ES-клетки можно заставить дифференцироваться в культуре альтернативными путями. Есть надежда, что в будущем ES-клетки

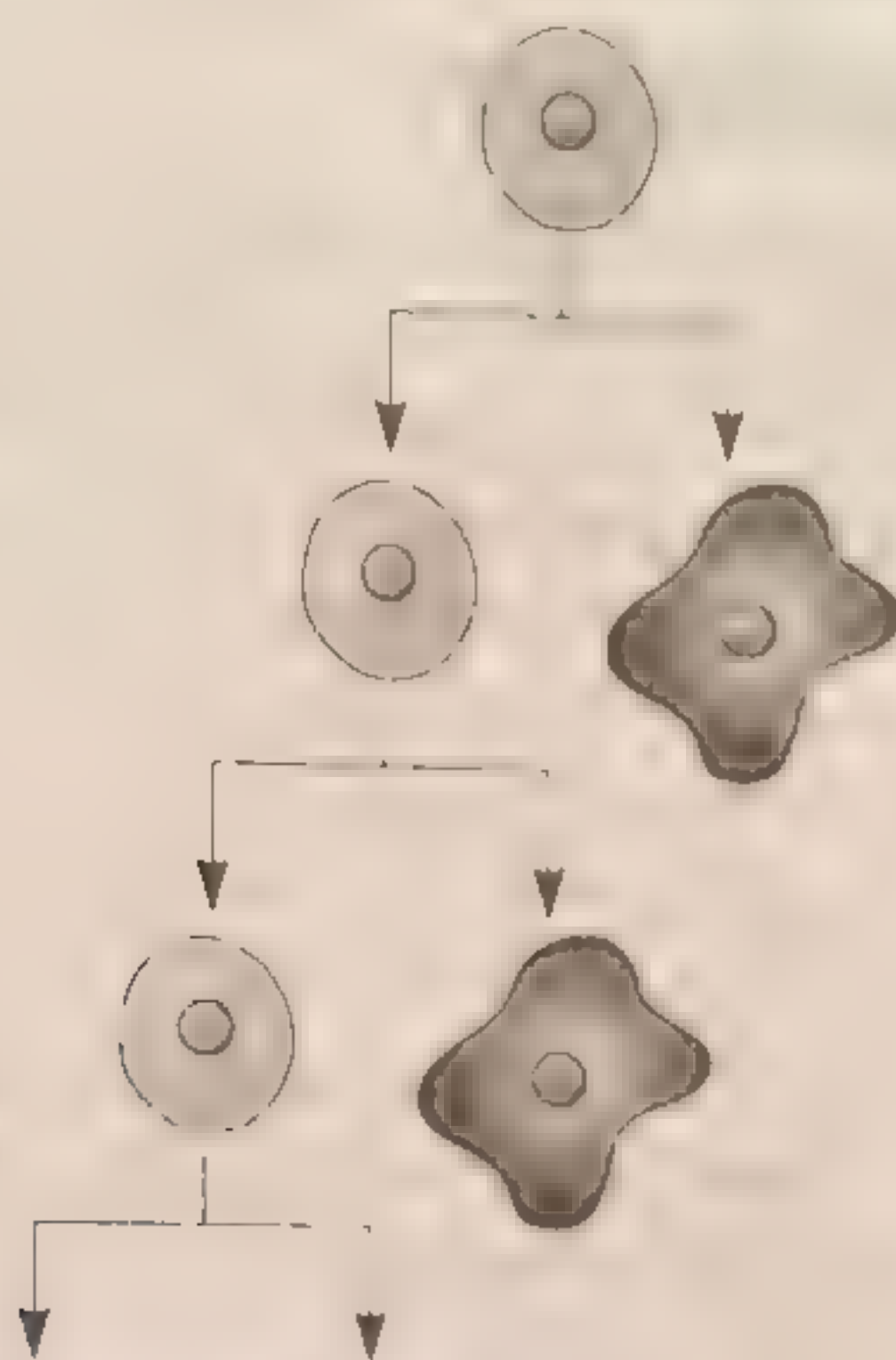


Рис. 8-12 Стволовые клетки дают два типа дочерних клеток: еще одну стволовую клетку и клетку, которая дифференцируется. Таким образом, стволовые клетки могут обновлять такие ткани как кожа, кровь и внутренняя поверхность кишечника, непрерывно в течение всей жизни. Недавнее открытие того, что стволовые клетки взрослых могут трансдифференцироваться (давать неожиданные дочерние клетки, например нейроны из гемопоэтических стволовых клеток), инициировало дискуссии относительно клонирования и терапии стволовыми клетками (см. текст).

можно будет использовать для выращивания замещающих клеток, тканей и, возможно, целых органов. Строго говоря, ES-клетки не настоящие стволовые клетки, потому что они не воспроизводят себя на каждом раунде клеточного деления. Истинные стволовые клетки делятся и дают такую же дочернюю стволовую клетку, а также другую дочернюю клетку, которая подвергнется дифференциации (рис. 8-12). Многие **стволовые клетки взрослых** обладают этим свойством. Такие клетки найдены во многих тканях и включают гемопоэтические стволовые клетки (которые производят все клетки крови и иммунной системы), стволовые клетки мозга (которые дают начало нейронам и глиальным клеткам), мышечные стволовые клетки (дают зрелые мышечные клетки) и стволовые клетки кожи. Некоторые из этих клеток, как правило, находятся в покое, в то время как другие активны в течение всей жизни (стволовые клетки кожи). Стволовые клетки мультипотентны, поскольку дают начало широкому диапазону различных типов клеток, хотя и не обеспечивают такое разнообразие, как ES-клетки. Однако недавно было показано, что стволовые клетки взрослых в некоторых случаях могут подвергаться **трансдифференциации**, т. е. давать начало нетипичным дочерним клеткам. Например, стволовые клетки мозга, как было показано, производят лимфоциты и миелоидные клетки, в то время как гемопоэтические стволовые клетки могут продуцировать нейроны. Появляется поразительная возможность использовать легко изолируемые стволовые клетки, в частности костного мозга, для создания новых клеточных популяций в мозгу, например, при болезни Паркинсона.

Стволовые клетки и клонирование

Одна из проблем клеточной терапии связана с **острым отторжением**, когда иммунная система реципиента распознает клетки как чужие и делает попытку их разрушить. Эта проблема не возникает, если используются стволовые клетки самого пациента, но в большинстве случаев такие клетки не доступны. Один из путей решения этой проблемы — **клонирование**, т. е. использование ядра из клетки пациента для замещения ядра в оплодотворенной клетке. Полученный эмбрион несет тот же генетический материал, что и донор, и может предоставлять богатый источник совместимых с организмом пациента стволовых клеток. Этот процесс, известный как терапевтическое клонирование, вызывает серьезные возражения с этической точки зрения, поскольку может рассматриваться как первый шаг к репродуктивному клонированию (дополнение 8-4).

Дополнение 8-4 Этические аспекты клонирования человека

Первым млекопитающим, клонированным из взрослой клетки, стала овечка Долли, созданная Яном Вилмутом и сотрудниками из института Рослина в Эдинбурге

(Великобритания). Метод прост в теории, но очень сложен на практике (рис. Д8-4). Перенос ядер осуществляли путем слияния соматических клеток из культивированной



Рис. Д8-4 Схема процедуры клонирования млекопитающих из взрослых клеток.

линии эпителиальных клеток молочной железы с энуклеированными ооцитами (ооциты с удаленными ядрами). Из среды культивации донорских клеток предварительно удаляли сыворотку, в результате клетки (выходили из клеточного цикла и) переходили в фазу покоя. Этот шаг оказался существенным для достижения успешного результата. Но даже при таких условиях только 29 из 434 ооцитов оказались подготовленными для стадии переноса, и только одна Долли выжила.

Рождение Долли вызвало неистовство в средствах массовой информации, а также инициировало публичные дебаты о возможности клонирования человека и этических проблемах, которые при этом возникают. Необходимо различать **терапевтическое клонирование**, которое предназначено для получения клеток и тканей, необходимых для данного пациента, и **репродуктивное клонирование**, которое предполагает создание новых человеческих индивидуумов, аналогично созданию Долли.

Как и в случае зародышевой генной терапии (дополнение 8-1), одним из наиболее важных (этических) возражений против репродуктивного клонирования является то, что технология далеко несовершенна, и результаты могут быть непредсказуемы. Действительно, после Долли были получены сотни клонированных млекопитающих различных видов, и многие из тех, кто вы-

жил, обнаруживали признаки врожденных дефектов и других болезней. Другое основание для беспокойства при репродуктивном клонировании, имеющее принципиальное значение, — неестественный (неприродный) путь создания жизни, в отличие от процедуры «искусственного» оплодотворения *in vitro*, которая просто помогает нормальному, естественному процессу оплодотворения. Несмотря на все эти предупреждения одна религиозная группа в Америке объявила в начале 2003 г. о клонировании, по крайней мере, пяти человеческих организмов, хотя еще неизвестно, правда ли это.

Хотя терапевтическое клонирование не должно вызывать таких споров, как репродуктивное клонирование, многих людей все еще оскорбляет идея, что человеческая жизнь может быть создана для получения «запасных частей». Некоторые люди просто плохо понимают, о чем идет речь, поскольку только эмбрионы, полученные в клиниках традиционным искусственным оплодотворением, будут использованы для процедур клонирования, в то время как другие критики с подозрением относятся к терапевтическому клонированию, так как видят в этом окольный путь к репродуктивному клонированию. В настоящее время законы в отношении клонирования в разных странах мира различны и продолжают меняться в зависимости от общественного мнения.

Трансплантация органов

Мы заканчиваем эту главу коротким обсуждением проблемы трансплантации органов — традиционной, основанной на клетках терапии. Она используется в случае выхода из строя какого-либо органа, но обладает тем недостатком, что приходится длительное время ждать появления подходящего донора. Как и в случае других методов клеточной терапии, одна из главных проблем, связанных с трансплантацией органов, — острая реакция отторжения, и это означает, что должен быть найден донор с подходящим типом ткани. В будущем функциональные органы для замещения вышедших из строя человеческих органов можно будет получать от трансгенных животных, в частности из свиней. Этот подход называется **ксенотрансплантацией**. Идут ожесточенные обсуждения этических аспектов ксенотрансплантации, особенно проблемы безопасности процедуры. Например, есть опасность, что эндогенные ретровирусы свиней активируются после трансплантации, возможно, даже рекомбинируют с челове-

ческими ретровирусами и дадут новые мощные гибриды с неизвестными свойствами. Если отвлечься от этической стороны дела, то метод имеет ограниченное применение из-за технических трудностей, включающих узнавание хозяйской иммунной системой свиных антигенов в донорской ткани. Острое отторжение зависит от антител, вырабатываемых против чужеродного органа, и активации хозяйской системы комплемента. В обоих случаях главный компонент механизма запуска реакции отторжения — дисахаридная группа (Gal- α -(1,3)-Gal), присутствующая в организме свиньи, но отсутствующая у приматов.

Было изучено несколько трансгенных подходов с целью преодоления острой реакции отторжения:

- экспрессия в донорском органе белков, инактивирующих систему комплемента;
- экспрессия антител против иммуногенной дисахаридной группы;
- введение генов, кодирующих другие ферменты, метаболизирующие сахара;
- ингибирование α -(1,3)-галактозилтрансферазы (фермента, который образует именно эту углевод-углеводную связь и который есть у свиней, но отсутствует в организме приматов).

В последнем случае самым простым подходом было бы выключение гена α -(1,3)-галактозилтрансферазы путем гомологичной рекомбинации. Об этом сообщалось двумя независимыми исследовательскими группами в 2002 г. В обоих случаях после переноса клеточных ядер в ооциты с предварительно удаленными ядрами родилось несколько живых поросят. Донорскими клетками служили зародышевые фибробласты, в которых гены α -(1,3)-галактозилтрансферазы были разрушены путем мутагенеза гомологичными конструкциями. Одна из исследовательских групп сообщила о рождении пяти здоровых поросят в день католического рождества 2001 г. (поэтому их назвали Ноэль, Ангел, Стар, Джой и Мэри), в то время как другая группа сообщила о рождении своих четырех поросят тремя месяцами ранее. Свиньи, использованные второй группой, были миниатюрной породы, что дает преимущества с точки зрения размеров органов, сопоставимых с таковыми у людей-реципиентов. Хотя проблема острой реакции отторжения была почти решена с помощью такого подхода, могут возникнуть другие проблемы, включающие отложенную иммунную реакцию отторжения (с участием природных клеток-киллеров и макрофагов) и требование толерантности Т-клеток.

Дополнительная литература

POGM: Гл. 10 посвящена переносу генов в животные клетки, гл. 11 — генетической модификации животных, в том числе, клонированию. В гл. 13 обсуждаются некоторые более усовершенствованные варианты рассмотренных в данной главе подходов с использованием антисмысловых олигонуклеотидов, рибозимов и РНК-интерференции. Гл. 14 включает разделы по генной терапии, ДНК-вакцинам и животным моделям болезней.

POGA: В гл. 10 обсуждается использование широкомасштабного мутагенеза и скрининга по интерференции (метода интерференции) для идентификации подходящих моделей болезней.

Четыре статьи, в которых рассматриваются технические и этические проблемы клонирования и клеточной терапии с использованием стволовых клеток:

Daley GO (2002) Prospects for stem cell therapeutics: myths and medicines. *Curr Opin Genet Dev* 12, 607–613.

Gordon JW (1999) Genetic enhancement in humans. *Science* 283, 2023–2024.

Johnson M (1998) Cloning humans? *Bioessays* 19, 737–739.

Weissman IL (2002) Stem cells — scientific, medical and political issues. *New Engl J Med* 346, 1576–1579.

Три очень важные статьи, посвященные технологии, применению и проблемам безопасности генной терапии:

Davies JC, Geddes DM, Alton EFW (2001) Gene therapy for cystic fibrosis. *J Gene Med* 3, 409–417.

Kay MA, Glorioso JC, Naldini L (2001) Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Med* 7, 33–40.

Somia N, Verma IM (2000) Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genetics* 1, 91–99.

Три статьи, описывающие, каким образом мыши и полосатый данио могут быть использованы для моделирования человеческих болезней:

Dooley K, Zon LI (2000) Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opin Genet Dev* 10, 252–256.

Muller U (1999) Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev* 82, 3–21.

Shastri BS (1998) Gene disruption in mice: models of development and disease. *Mol Cell Biochem* 181, 163–179.

Хороший краткий обзор принципов действия и областей применения ДНК-вакцин:

Reyes-Sandoval A, Ertl HC (2001) DNA vaccines. *Curr Mol Med* 1, 217–243.

В статье представлен взгляд на современное использование РНК-интерференции в качестве инструмента исследования функции человеческих генов и на возможности ее применения в терапевтических целях в будущем:

Tuschl T, Borkhardt A (2002) Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Intervent* 2, 158–167.

Предметный указатель

Если термин встречается в рисунке — то номера страниц выделены *курсивом*, а если в таблице или дополнении — **жирным шрифтом**.

- Абзимы 166
авермектин 219
автономные репликоны 17
агар 15
агонист 199
агонисты β_2 -адренергических рецепторов 141
адгезины бактерий, нефимбриальные 98
аденоассоциированные вирусы (AAB) 230
аденовирусные векторы 230, 232, 235
аденозиндезаминаза (ADA), дефицит 129, 235–236
адоптивная биотерапия 165
адсорбция, распределение, метаболизм и экскреция (АРМЭ) 199
азидотимидин 118, 118
активационные ловушки 163, 164
аллели 42
аллель-специфическая гибридизация 27
аллель-специфические олигонуклеотиды (АСО) 27, 122–123, 124
альбутерол 141
амплификация, ДНК 17, 19
анализ последовательностей 34
анализ сцеплений безмодельный (непараметрический) 135–136, 135
ангиогенез, опухоль 167
ангиотензин-превращающий фермент (АПФ, *англ.* ACE), нокаутные мыши 210
анестезия диэтиловым эфиром 15
анкилозирующий спондилоартрит 140
антагонист 199
антибиотики 87–88, 104
— в культурах клеток 183
— высокоэффективный скрининг 205, 208–209, 209
— продукция в бактериях 99
— разработка новых 107–110, 218–220, 219
— устойчивость 107, 107
антиген 172
— детекция, инфекционные заболевания 94
антигены человеческих лейкоцитов, *см.* гены HLA
антиидиотипические антитела 165–166
антипротозойные лекарства 89
антиретровирусная терапия 117–119, 119, 243, 244
антисмысловые лекарства 118–119, 239, 240–241
— ВИЧ-инфекция 243, 243–244
антитела 172–174
— в локализации/диагностике рака 155
— в лечении рака 159, 164–166
— детекция в сыворотке 94
— моноклональные, *см.* моноклональные антитела
— рекомбинантные 30
антитело-направленный фермент/пролекарственная терапия, ADEPT 166
апикопласт 115
аптамеры олигонуклеотидные 239, 240, 242–244
АРМЭ *см.* адсорбция, распределение, метаболизм и экскреция
атеросклероз 68
аффинная хроматография 76, 77
аффинные изотопные метки (ICAT) 75
ацикловир 117, 118

Базы данных 34–35
белковых структур 59, 58–59, 73
последовательностей 58, 59, 59
базы данных последовательностей 58–60
— первичные 58, 59
— вторичные 58, 59
бактериальные инфекции 86–88
— — вакцины 87, 87, 80–82
— — лечение 87–88
— — обнаружение новых 89–91

бактериальные искусственные хромосомы
(ВАС, *англ.*) 46, 46

— — — патогенность 97–100

— — — пластичность генома 100–103

— — — производство биофармацевтиче-
ских препаратов 170

— — — размеры генома 86

— — — сравнительная геномика 100–103,
102, 103

бактерии 86, 86–88

— *Escherichia coli* 52

— — — модели болезней 246

— — — производство биофармацевтиче-
ских препаратов 185, 186, 188, 189, 191

— — — энтероинвазивные штаммы 101–102

— *Salmonella* 98, 101

— — дифференциальная индукция флуо-
ресценции 110

— *Salmonella typhimurium* 104–105

— — — мутагенез методом мечения марке-
ром 110–111, 111

бактериофаг фХ178 52

бакуловирусы 230–231

БГЭ, *см.* бычья губчатая энцефалопатия

белковые микрочипы 71

— — аналитические 71

— — функциональные 71

белок (белки)

— анализ взаимодействий 25, 34, 69–70,
76–80

— — экспрессии 34

— — локализации 25

— бейт 77–78, 79

— глобальный анализ, *см.* протеомика

— масс-спектрометрическая характери-
стика 73–74, 75

— неизвестные (“безымянные”) 73

— посттрансляционная модификация
191–195, 193–194

— преи 77–78, 79

— рекомбинантные 29–30

— ретинобластомы 149, 166

— терапевтические, *см.* терапевтические

— типы укладки 60

— участки пониженной сложности 61

— функциональная классификация 60

— MalE 189–190

— p53 131, 152, 166

библиотека (и) ДНК 19–20

— комбинаторные, *см.* комбинаторные
библиотеки

— мутантов, полные 80

— пептидные 212–213, 214

— скрининг 20

— экспрессионные 21

биоинформатика 34

биосенсоры оптические 203

биотерапия рака 164–167

— адоптивная 165

биотерроризм 92, 92, 95

биофармацевтические препараты 169–198

— — альтернативные системы производ-
ства 197–198

— — производственные процессы 186–191

— — качество 191–195

— — крупномасштабные системы культи-
вирования клеток 176–184

— — международный стандарт качества
GMP 195–197, 196

— — типы 169, 169

— — экспрессионные системы 184–186

болезнь Альцгеймера 249

— Крона 137–138, 137

— Чагаса 113

больные семьи с сиб-парами 135, 136

бомбардировка частицами, перенос ДНК
234

браузер EnsEMBL 56, 57

Бреннер Сидни 41

бычья губчатая энцефалопатия (БГЭ) 182,
195

БААВТ (*англ.* HAART), *см.* высокоактив-
ная противовирусная терапия

вакцина(ы) 104–107

— бактериальные патогены 86–87, 87

— бациллы Кальметта—Герена (BCG) 102,
105

— вирусные 86

— гепатита В 106

— генная терапия, *см.* векторы для генной
терапии

— “дженнеровы” 30

— ДНК, *см.* ДНК-вакцины

— искусственные хромосомы 46, 46

— клонирующие, *см.* клонирующие векторы

— против бешенства 106

— протозойные инфекции 112–116

— разработка новых 104–107

— рекомбинантные субъединичные 30

- валидация мишени 201, 209–212
 - процедур очистки 191
 - процесса 195
- вариабельные (V) участки, иммуноглобулины 172, 173
- вариации (вариабельность), генетические 35, 42–43
 - геномные 43
 - изученные 43
 - типы 42–43
- векторы для генной терапии
 - — — вирусные 230–231, 229–232
 - — — невирусные 230, 232–34
 - — — стандарты качества 192
- Вернера* синдром 249
- вестерн-блоттинг 25
 - в диагностике моногенных болезней 126, 126–127
- винбластин/винкристин 162–163, 163
- виросомы 234
- виртуальный скрининг 217–218
- вирулентность 85
- вирус иммунодефицита человека, см. ВИЧ
 - лихорадки Западного Нила 95
 - простого герпеса (ВПГ) 231, 239
 - Эпштейна–Барра, трансформация клеток 181, 181
- вирусные инфекции 85–86
 - — вакцины 86, 105–106
 - — вновь обнаруживаемые 90–91
 - — см. также противовирусные препараты
- вирусы 85–86
 - векторы для доставки генов 229–232, 230–231
 - герпеса 117, 231
 - канцерогенные 149
 - классификация по *Балтимору* 116, 117
 - помощники 231
 - с нарушенной репликацией 231
- витамин А 164
- витравен 240
- ВИЧ 231
- ВИЧ-инфекция/СПИД 91, 95
 - — генная терапия 243–244, 243
 - — лекарственная терапия 116–118, 119
 - — устойчивость организма-хозяина 97
- вортманин 162
- вредные факторы окружающей среды и рак 149
- времяпролетный детектор (TOF) 73, 74
- вставки 122, 123
- высокоактивная антивирусная терапия (ВААВТ) (*англ.* HAART) 117
- высокоскоростные шаровые мельницы 187, 188
- высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) 73
- высокоэффективный скрининг 202–209
- β -галактозидаза 81–82
- Гамма-сцинтиграфия 176
- ганцикловир 117, 238, 239
- гаплотипные блоки 43, 138–141
- гаплотипы 35–36, 138
- гаплотипы HLA 140–141
 - диабет, тип I 136
 - наследование 141
- гарантии качества 196
- гель-электрофорез 18, 20
 - в протеомике взаимодействий 76, 77
 - в пульсирующем поле (PFGE) 96, 97
 - для разделения ДНК 20
 - для разделения белков 70–73
- гемифилия В 129
- гемоглобина фетального наследственная персистенция 123
- гемоглобинопатии, см. также серповидноклеточная анемия; талассемия 27, 28
- гемолизины 99
- ген ацетил-СоА-карбоксилазы 2 211
 - родопсина 133
 - тимидинкиназы 238, 239
 - фактора некроза опухоли 238
 - ABL 150
 - CD36 68
 - CFTR 235
 - EGR1 68
 - ERBB2 150
 - HEXA 249
 - MLH1 152
 - MYC 150
 - RB1 149
 - TP53 152
 - VEGF 68–69
- генетическая и половая предрасположенность и рак 149
- генетические заболевания 27, 121–144; см., также моногенные болезни; полигенные болезни
 - — пренатальная диагностика 122, 129, 143

- генетические различия (выявление) 142
- генетическое картирование 42–45
- генетическое тестирование, социальные и этические проблемы 143–144
- генная ловушка 81–82, 82
- генная медицина 31, 225
 - – инфекционные болезни 243, 243–244
- генная репарация 129–131
- генная терапия 31, 225, 226–239
 - – добавление гена 228, 227
 - – заместительная 228, 227
 - – зародышевая 226, 226
 - – ингибирование гена 228, 227
 - – механизмы доставки генов 229–234
 - – моногенных болезней 128–131, 226–228, 234–237
 - – подходы 226–228, 227
 - – примеры лечения заболеваний 234–239
 - – пути доставки генов 228–229
 - – рак 228, 237–239, 238
 - – соматическая 129, 226, 228
 - – уничтожение специфических клеток 227, 228
 - – этические аспекты 226
 - – *ex vivo* 229, 229
 - – *in vivo* 229, 229
- геном 39
 - аннотирование 54–57
 - геномные браузеры (программы просмотра) 56, 57
 - пластичность 100–103
 - проект, “календарь” основных результатов 52
- геномика 38–83; см. также проект “Геном человека”
 - влияние на медицину 32–35
 - генетическое картирование 42–45
 - мутационная 80–83
 - определение 39
 - роль в изучении рака 153–155
 - сравнительная, см. сравнительная геномика
 - структурная 34
 - физическое картирование 45–49
 - функциональная, см. функциональная геномика
 - этапы становления 38–57
- геномная ДНК 20, 21
- геномные вариации 43
- гены, активность 23, 25–26, 34
 - глобинов 20
 - идентификация и клонирование 20–23
 - копияность 185
 - маркерные 233, 233
 - мишени для генной терапии 238
 - опухолевых супрессоров 150–151
 - – – идентификация гена-кандидата 153–154
 - – – механизмы исключения 151
 - общее число в геноме человека 55
 - потеря гетерозиготности (LOH) 153, 153
 - – – анализ (LOH) 153, 153
 - предрасположенности к опухолевым заболеваниям 151
 - предсказание на основании последовательности ДНК 55–56
 - рецепторов меланокортина-3 и -4 211, 211
 - “самоубийства” 228, 238, 239
 - сироты 58
 - семейства *RAS* 150
 - функциональная характеристика 23, 25–26, 25
 - *BRCA1* и *BRCA2* 143–144
 - *HLA* 97, 139–141, 141
 - функция 151–152
- герцептин 165
- Гершмана–Штресслера–Шейнкера (GSS) синдром 249
- гетерохроматин 54
- гибридизация 20, 24
 - аллель-специфическая 27
 - мультиплексная 63
 - на колониях 24
 - на фаговых бляшках 24
 - ненасыщающая 67
 - *in situ* 24
- гибридомы 173
- гистонов ацетилирование/деацетилирование 167
- главный комплекс гистосовместимости (ГКГ) 136, 138–141
- гливек (ST-1571) 161, 162
- гликаны 193–194
- гликозилирование
 - биофармацевтических препаратов 191–195
 - лектиновые микрочипы для анализа 193–194
- гликопротеины 29, 193–194
- гликоформы 193–194

- глутатион-S-трансфераза 189–190
 глютенная болезнь 140
 гомогенизаторы высокого давления 187, 188
 гомогенный анализ 203
 гормон роста 29
 грибковые инфекции 88–89
 — — борьба 112
 — — факторы вирулентности 112
 гуманизированные антитела 172, 174
- Даунорубин 219
 — двумерный гель-электрофорез (2DGE) 71–72, 72
 — в диагностике рака 157, 158
 двухцепочечная РНК (дцРНК, dsRNA) 239, 241–242, 242
 1-дезоксид-Д-ксилоулозо-5-фосфат (DOXP), биосинтез 115
 деконволюция 213, 215
 делеции 122, 123
 денатурация, в ПЦР 17, 19
 дефект расщелины позвоночника без спинномозговой грыжи 250
 Дженнер Эдвард 29
 диабет
 — мышечная модель 249
 — тип I, связь с генами HLA 136
 диагностика 26–27, 28
 — генетические заболевания 122–127
 — инфекционные болезни 89–91, 93
 — профили экспрессии генов 69
 — рака 155–158, 176
 дивергентный синтез, метод 213, 214
 дигидрогранатиродин 220
 ДИГЭ, см. дифференциальный гель-электрофорез
 дистрофин 126, 132
 — ген 130, 131–132
 дифференциальная индукция флуоресценции 110
 дифференциальный гель-электрофорез (ДИГЭ, *англ.* DIGE) 75
 ДНК инкапсулированная, перенос генов 233–234
 — метилирование 167
 — прямой перенос 232–234
 — трансфекция 232–234
 ДНК-вакцины 31, 106, 225, 244–245, 245
 стандарты качества 192
- ДНК-зонды 20, 24
 ДНК-лигазы 16
 ДНК-микрочипы 63, 65, 66, 67
 — в токсикогеномике 222–223
 — диагностика рака 156–157, 156
 — окрашенные ячейки 67, 68
 — олигонуклеотидный микрочип высокой плотности 63, 65, 66, 67
 — точечный 63, 65, 66
 ДНК-полимеразы 16, 17
 додецилсульфат натрия (ДСН, *англ.* SDS) 72
 доклинические испытания 200–201
 Долли (овца) 252–253
 доминантно-негативный подход 244
 донепезил 222, 223
 дрожжевая двугибридная система 77–80, 79, 155
 дрожжевая искусственная хромосома (YAC) 46, 46
 дрожжи, производство биофармацевтических препаратов 170
 — пекарские, *Saccharomyces cerevisiae* 33, 34, 52
 — — культивирование крупномасштабное 186
 — — модели болезней 246
 — протеом 71
 — функциональное аннотирование генов 61
 ДСН-ПААГ 72, 72
- Евгеника 226
- Зеленый флуоресцентный белок (GFP) 110
 зидовудин 118
 зонды на основе нуклеиновых кислот 20, 24–25
 зоо-блоттинг 132
- Идентичны по происхождению (ипп, *англ.* IBD) 136
 изопреноиды 115
 изоэлектрическая фокусировка (ИЭФ) 71–72, 72
 иммортализация 181, 181
 иммуноанализ, инфекционные болезни 94
 иммуноглобулины 172–173, 173
 иммунодефицитные пациенты 88
 иммуноконъюгат BR96-DOX 166

иммунопрепараты 165, 165
 иммунотоксины 165, 176
 иммуоцитокны 166, 176
 импеллер *Раштона* 177, 178
 инвазии факторы 98
 ингибиторы HIF-1a 167
 — обратной транскриптазы 118, 119
 — протеаз (PI) 118, 119
 индирубин 162
 индукция флуоресценции, дифференци-
 альная 110
 инсулин 29
 — сигнальный путь 61
 — синдром резистентности 68
 интерлейкин 2 (IL-2)
 — в лечении рака 164
 — потеря гамма-цепи рецептора 237
 — слитый с антителом 165, 166
 интерферон
 — альфа 164
 — бета 191, 193
 — гамма 191
 интраантитела 243, 244
 инфекционные заболевания 85–120
 — — возникновение новых 89–91
 — — генная терапия 243–244, 243
 — — ДНК-вакцинация 106, 244–245, 245
 — — идентификация возбудителей болезни
 91–95, 93, 94
 — — лечение и предотвращение 104–119
 — — микроорганизмы 85–89
 — — молекулярная эпидемиология 95–97
 — — устойчивость организма-хозяина 97
 ионообменная хроматография 189
 иресса (ZD1839) 162
 иррациональный дизайн лекарств 212
 искусственные хромосомы P1 (PAC) 46
 искусственные хромосомы, векторы 46, 46
 исследование токсичности, новые лекар-
 ства 199–200
 иттрий-90 159, 176

Калбиндин 76
 картирование генов 131
 — неравновесных сцеплений 137–138, 137
 — STS 48–49, 49
 карцинома 146
 карциноэмбриональный антиген 156
 катепсин К 211

киРНК (siRNA) см. короткие интерфери-
 рующие РНК
 кистозный фиброз (КФ, муковисцидоз)
 123, 132, 235
 класса обнаружение 157
 — предсказание 157
 клетки immortalized 181, 181
 — крупномасштабное разрушение 187, 188
 — пролиферация, молекулярный контроль
 151–152
 — трансформированные 181
 — уничтожение специфических 227, 228
 клетки животные см. также клеточные
 культуры
 — — производство биофармацевтических
 препаратов 169, 170
 клеточная терапия 225, 250–254
 клеточные культуры
 — — вторичные 180
 — — первичные 180
 — — крупномасштабное культивирование
 180–84
 — — опорно-зависимые клетки 183–184
 — — питательные среды 182–184, 182
 клеточные линии 180–181
 — — используемые в производстве био-
 фармацевтических препаратов 182
 — — пакующие 231, 232
 клинические испытания 200, 200–202
 клонирование 17–18
 — в клетках 18, 17
 — позиционное 23, 131–132
 — ПЦР 17
 — репродуктивное 252, 253
 — специфических генов 20–23
 — стволовые клетки 252–254
 — терапевтическое 252, 252
 — человека, этические аспекты 252–253
 клонирующие векторы 17, 18
 — — большие вставки 45–46
 — — в крупномасштабном производстве 185
 коиммунопреципитация 76
 колоректальный рак 146, 148
 комар *Anopheles gambiae* 52
 комбинаторная химия 212–216
 — — динамическая 216
 комбинаторные библиотеки 212–215
 — — динамические (ДКБ) 216–217
 — — деконволюция 213, 215
 комбинаторный синтез 218–220

- комплексные болезни см. полигенные бо-
 лезни
 Консорциум генных онтологий 60
 контиги 45
 контроль качества 195, 196
 — производственного процесса 196
 копияность, генов 185
 короткие интерферирующие РНК
 (киРНК, *англ.* siRNA) 239, 241–232, 242
 космиды 45
 Кох Роберт 15
 крупномасштабное культивирование 177,
 178
 крупномасштабное производство биофар-
 мацевтических препаратов 169–198
 крыса как модель 246
 ксенотрансплантация 253–254
- Ламивудин 118
 Левенгук, Антони ван 15
 лейкемия 146, 147
 диагноз 156, 156, 157
 связанная с генной терапией 237, 237
 лейкотоксины 99
 лейшманиоз 113, 115
 лекарства см. также биофармацевтиче-
 ские препараты
 — дизайн рациональный 70
 — индивидуальные реакции, см. фармако-
 геномика
 — иррациональный дизайн 212
 — метаболизм 221
 — на основе нуклеиновых кислот 239,
 239–244
 — неблагоприятные реакции 141
 — структурные характеристики лекарств-
 кандидатов 215, 216
 лекарственные препараты, разработка 35,
 199–223
 — — валидация мишеней и животные мо-
 дели 209–212
 — — виртуальный скрининг 217–218
 — — высокоэффективный скрининг
 202–211
 — — классический процесс 199–202, 202
 — — комбинаторная химия 212–217
 — — комбинаторный биосинтез 218–220
 — — метаболизм лекарств 221
 — — протеомика взаимодействий 69–70
 — — противораковые 160–164
 — — современные подходы 201, 202
 — — токсикогеномика 221–223
 — — химический биосинтез 220
 лекарство 17AAG 162
 — PS-341 162
 лектиновые микрочипы 193–194
 лидирующее соединение 199, 212
 лимфома 146
 — биотерапия 165
 — неходжкинская 157
 — подтипы 157
 лимфоциты, иммортализация 181, 181
 липоплекс 234
 липосомы для доставки ДНК 233
 липофекция 234
 ловастатин 219
 локус *NOD2* 138
 Лонг Кроуфорд 15
 Lexicon Genetics 82
- Мадагаскарский барвинок (*Catharanthus*
roseus) 162–163, 163
 максизимы 239, 240–241
 малярийный паразит (*Plasmodium*
falciparum) 52, 115
 — — жизненный цикл 114
 малярия 89, 89, 113, 113
 разработка вакцины 113–115
 — новых лекарств 115
 устойчивость организма-хозяина 97
 маркерные гены 233, 233
 маркерный ген *neo* 233
 маркеры рака 156–157
 — экспрессируемых последовательностей
 (EST) 48, 49, 55
 масс-спектрометрия (МС, *англ.* MS)
 73–75
 аннотация белков 75
 тандемная (MS/MS) 75
 MALDI-TOF 73–75, 74
 матрично-активированная лазерная де-
 сорбция/ионизация (МАЛДИ, *англ.*
 MALDI) 73–75
 “маяки” молекулярные 126, 125–127
 МДД см. мышечная дистрофия Дюшенна
 медерродин А 220, 220
 Международный консорциум по ОНП 43
 Международный проект НарМар 43

международный стандарт качества GMP
170, 195–197, 196

менингококки, группа В 105

метаболизм лекарств 221

метаболическая инженерия, растения
162–164, 163

метастазирование 146

метициллин-устойчивый золотистый ста-
филококк (*Staphylococcus aureus*, англ.
MRSA) 103

метод генов-кандидатов 133, 153–154

– дробовика, секвенирование 51

– иерархический 51, 53

– полногеномный 51, 53

– мечения маркером, мутагенез 110, 111

TaqMan 124, 125

миелома 146

микозы 88

микоплазмы 183

микрогетерогенность 193

микроорганизмы см. также бактерии;
инфекционные заболевания; вирусы

– вирулентные 85

– вызывающие болезни 85–86

– крупномасштабное культивирование
176–180

– модели болезней 246

– патогенные см. патогены

– производство биофармацевтических
препаратов 169–170, 169

микросателлиты 43, 44, 45

– анализ полигенных болезней 136, 138

– как STS-маркеры 48

– нестабильность 152

микрочипы

– белковые 71

– ДНК см. ДНК-микрочипы

– лектиновые 193–194

– GeneChips 65, 67

– фирмы Affymetrix 65

мимикрия, структурная 98

мишень 199

– валидация 201, 209–212

– выбор 203

– высокопроизводительный анализ свя-
зывания 201, 203–207

– трехмерная структура 217–208

млекопитающие

– клонирование 252–253

– трансгенные см. трансгенные живот-
ные; см. также мыши

множественный параллельный синтез 212

модели болезней 31–32, 225, 245–250, 246

– – комплексных 250

– – моногенных 246–249

– – подтверждение действенности (вали-
дация) препарата 209–212, 211

– – молекулярная медицина 15–16, 26–31

– – инструменты диагностики 26–27, 28

– – новая 35–36

– – рекомбинантные белки 29–31

молекулярный “маяк” 125, 126

моногенные болезни 121–122, 123

– – генная терапия 128–131, 226–228,
234–235

– – диагностика 122–127, 126, 127

– – лечение 128–131, 128, 130

– – модели 245–249

– – поиск/характеристика дефектных ге-
нов 131–133

моноклональные антитела 172–176

– – гуманизированные 172, 174

– – лечение рака 164–167, 174, 175–176

– – названия 172

– – применение в медицине 30–31, 171

– – производство 172–175

– – радиоактивно меченные, диагностика
рака 155–156, 175–176

– – химерные 174–175

монослой 180

моноциклин 212

морфолино-олигонуклеотиды 240

мРНК, глобальный анализ 62–69

мРНК эпидермального фактора роста 2
(ЭФР-2, англ. EGF-2), мишень рибози-
ма 130, 241

мультилокусное сиквенсное типирование
97

мультиплексная гибридизация 63

мутагенез всего генома 80

– методом мечения маркером 110, 111

– на основе ДНК (инсерционный) 80, 81

– насыщающий 80

– проекты, на мышах 80–82, 133–134

– химический 80

мутации 42

– в раковых клетках 147–149

– вставки и делеции 122, 123

– детекция 122–127

– ДНК-диагностика 26–27, 28

– точковые 122–123, 123

мутационная геномика 80–83

- мутация в гене $\alpha(1$ - индекс)-антитрипсин 123–124
- мышечная дистрофия 126, 127
- Дюшенна (МДД) 130, 131–132
- мышь (и) (*Mus musculus*) 246
- геном 52, 133–134
- метаболизм лекарств 221
- модели болезней 210, 245–249
- нокаутные см. нокаутные мыши
- проекты по мутагенезу 80–82, 134
- технология переноса генов 247–248
- трансгенные 247–248, 249
- Наследственный неполипозный рак толстой кишки (HNPCC) 152
- невирапин 118
- Немецкий консорциум генных ловушек 82
- немиелоаблативное кондиционирование 236, 236
- ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NNRTI) 118, 119
- неопластические заболевания 146
- неопластические клетки 181
- неравновесных сцеплений анализ 135–137, 137
- неустановленная ранее болезнь, кластеризация 157
- новые лекарственные препараты 199–224
- нозерн-блот-гибридизация 24
- нокаут генов 32, 246; см. также нокаутные мыши
- нокаутные мыши 32, 133–134, 246–249
- валидация лекарственных мишеней 211, 211
- с выключенным геном циклооксигеназы-1 210
- создание 247–248
- нуклеаза Dicer 241, 242
- нуклеозидные (аналоги) ингибиторы обратной транскриптазы (NRTI) 118, 119
- Обработка биофармацевтических препаратов 170, 186–191
- генетические манипуляции 189–191
- стадии 186
- образ жизни, риск возникновения рака 149
- обратная генетика 132
- обратно-транскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) 21
- однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП, англ. SNP), “снипы” 35, 42–43, 122, 131
- ассоциации с гаплотипами 138, 139
- в случае болезни Крона 137, 138
- в фармакогеномике 141–143
- картирование 42–43
- ожирение 211
- оксигенация (снабжение кислородом), крупномасштабное культивирование 176–177
- олигонуклеотиды аллель-специфические (АСО) 27, 122–124, 124
- антисмысловые см. антисмысловые лекарства
- аптамеры 239, 242, 244
- микрочипы 63, 65
- онкогены 149–150
- идентификация кандидата 153–155
- механизмы активации 150, 151
- терапевтические мишени 238–239
- функциональный анализ 153
- ОНП см. однонуклеотидные полиморфизмы
- оппортунистические патогены 88
- оптимизация 199
- оптические биосенсоры 203
- опухоли 146
- доброкачественные 146
- злокачественные 146
- локализация 155–156, 175–176
- орнитин-транскарбамилазы (ОТД) дефицит 230
- ортологи 246
- остеопороз 211
- острая лимфобластная лейкемия (ОЛЛ) 156
- острая миелоидная лейкемия (ОМЛ) 156
- острое отторжение 252, 253–254
- ОТ-ПЦР см. обратно-транскриптазная полимеразная цепная реакция
- очистка, аффинные ярлыки (tags) 189
- биофармацевтических препаратов 187–189, 190
- ошибки выборки, в последовательности генома человека 54
- Пакующая линия клеток 231–232, 232
- Пастер Луи 15

- патогенности островки (PAI) 100
 патогенность, бактериальная 97–100
 патогены 85–89
 – ДНК-диагностика 27
 – оппортунистические 88
 – секвенированные геномы 39
 – типирование в судебной медицине 95
 ПДАФ, см. полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (англ. AFLP)
 ПДРФ, см. полиморфизм длины рестрикционных фрагментов
 пептидные библиотеки 212–213, 214
 пептидный синтез
 – – классический метод *Меррифилда* 212–213, 213
 – – метод дивергентного синтеза 213, 214
 перенос ДНК, прямой 232–234
 персонализированная медицина 122, 143
 пигментный ретинит 133
 пили, тип IV 98–99
 питательные вещества, крупномасштабное культивирование клеток 185–186
 пититрин- α 162
 пищевые добавки 149
 пищевые отравления 90, 91
 плазмидная ДНК
 – – крупномасштабное производство 185
 – – очистка 189, 191
 – – перенос генов 232–233
 – – стандарты качества 191
 плодовая мушка *Drosophila melanogaster* 33–34, 246
 – – программы по мутагенезу 83
 – – секвенирование генома 51, 52
 – – сравнительная геномика 60–61
 плюрипотентность 250–251
 поверхностный плазмонный резонанс (SPR) 71, 203
 повторяющиеся последовательности ДНК
 – – – секвенирование генома 51, 53
 – – – фингерпринтирование 49
 позиционное клонирование 23, 131–132
 поиск сходства 58–61
 полиаргининовые “хвосты” 189, 190
 полигенные болезни (комплексные болезни) 121, 135–138
 модели 250
 поликетидсинтаза (ПКС) 218–220
 поликетиды 218–220, 219
 полимеразная цепная реакция (ПЦР)
 17–18, 19, 20–21
 – – – аллель-специфическая 27, 28
 – – – детекция мутаций 124–125
 – – – длинных фрагментов 21
 – – – идентификация микроорганизмов 94–95
 – – – инвертированная (обратная) 81, 81
 – – – обратно-транскриптазная (ОТ-ПЦР) 21
 – – – скрининг библиотеки ДНК 20
 полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ, англ. AFLP) 96, 97
 полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ, англ. RFLP) 42, 43, 44
 – – – – в диагностике болезней 27, 28
 – – – – генетические заболевания 127, 127
 полиморфизм простых повторов (SSRP) 43
 полиморфизмы, последовательностей ДНК 42, 42–43
 – – – влияющие на эффективность действия лекарства 142–143
 – – – молекулярная эпидемиология 96–97
 полинуклеотидкиназа 16
 полиплексы 234
 полосатый данио 246, 249
 полые волокна, культивирование животных клеток 183, 184
 посттрансляционная модификация 191–195, 193–194
 потеря функции гена 26, 151–152, 228
 правило “пяти” *Липински* 215, 217
 праймеры
 – отжиг 17, 19
 – ПЦР 17, 19
 – удлинение 17, 19
 пренатальная диагностика 122, 129, 143
 примеси в биофармацевтических препаратах 188–189, 188, 191, 192
 – международный стандарт качества GMP и 195–197
 – приобретение функции гена 26, 151, 228
 прионный белок 249
 пробелы в последовательности генома человека 54
 прогулка по хромосоме, метод 22, 23, 47
 проект “Генетическая анатомия рака” (Cancer Genome Anatomy Project) 35, 154, 155

- проект "Геном человека" (англ. HGP)
 32–33, 36, 38–57
 — — — аннотирование генома 54–57
 — — — генетическое картирование 42–45
 — — — первоначальные задачи 40
 — — — стратегия секвенирования 49–51, 53
 — — — физическое картирование 45–49, 48–49
 — — — "черновые" варианты и окончательный 54
 — — — этические, юридические и социальные аспекты (ЭЮСА, англ. ELSI) 40, 40
 проект "Разнообразие генома человека" (HGDP, англ.) 43
 производство 196
 промотор метанол-оксидазы 185
 промоторы, крупномасштабные экспрессионные системы 184–186
 пронуклеарная микроинъекция 247–248
 протеом 69
 — методы разделения 70–73
 протеомика 39, 69–70
 — в диагностике рака 157–158, 156
 — в разработке лекарств 209, 210
 — взаимодействий 69, 76–80, 77
 — структурная 70
 — экспрессионная 69, 70–76
 противовирусные препараты 86
 — — разработка 116–119
 — — структура 118
 противогрибковые препараты 88
 протозойные инфекции 89, 89
 — — разработка новых лекарств 115
 — — успехи в лечении 112–116
 — — см. также малярия
 протоонкогены 149
 — механизмы активации 150, 151
 — функция 151
 псевдоген 55
 псориазин 158
 ПЦР, см. полимеразная цепная реакция
- Радиационные гибриды 48–49
 радиоавтография 24
 радиоактивно меченные антитела для диагностики рака 155–156, 175–176
 радиоиммунотерапия 159, 160, 175–176
 радиотерапия 159
 рак 146–170
 — биотерапия 164–167
 — генная терапия 230, 237–239, 238
 — груди 144, 146
 — диагностика 155–158, 175–176
 — кожи 147
 — легких 147
 — молекулярные основы 147–152
 — мочевого пузыря 157
 — наиболее распространенные формы 147
 — наследственная предрасположенность 148, 149
 — новые терапевтические мишени 166–167
 — предрасположенность 149
 — прогрессия 150
 — простаты 146
 — радиоиммунотерапия 159, 160, 175–176
 — роль геномики 153–155
 — сравнительная геномная гибридизация (CGH) 153
 — терапия 158–167, 175
 — химиотерапия 160–164
 — эволюционный процесс 148
 — яичка 147
 — яичников 144, 147, 159–160, 160
 растения метаболитическая инженерия 162–164, 163
 — трансгенные 197–198, 197
 рациональный дизайн лекарств 70
 реактор цилиндрический, с перемешиванием 177, 179
 ревматическая лихорадка 103
 редукционистский подход 32
 рекомбинантные белки 29–30; см. также терапевтические белки
 рекомбинантные вирусы коревой оспы 105–106, 105
 рентгеновская кристаллография 217–218
 репортерные гены 81, 82
 репортерный ген *lacZ* 81
 ретровирусы 117–119
 — как векторы для доставки генов 231, 237, 237, 238–239
 — эндогенные, ксенотрансплантация и 253–254
 рецептор-опосредуемый эндоцитоз 234
 речная слепота" (онхоцеркоз) 116
 рибозим Herzyme 130, 241
 рибозимы 130, 131, 239, 240–241
 — ВИЧ-инфекция 243, 244
 — модели болезней 249
 — структура 240–241

рибонуклеаза (РНаза) бычья 191
 — слитая с антителом 166
 рибонуклеаза Р 130
 риботипирование 96
 рибин, конъюгаты с антителами 165, 176
 РНК двухцепочечные (дцРНК) 239,
 240–241, 242
 — зонды 20, 24
 — малые интерферирующие РНК
 (киРНК, *англ.* siRNAs) 239, 241–242,
 242
 РНК-индуцированный “сайленсинговый”
 комплекс (RISC) 241, 242
 РНК-интерференция (RNAi) 83, 241–242,
 242
 РНК-ловушки 243, 244
 роллерные бутылки (вращающиеся сосуды)
 184

Саркомы 146

саузерн-блоттинг (блот-гибридизация по
 Саузерну) 24
 — диагностика генетических болезней 123,
 124, 125, 127, 127
 свиньи с “выключенным” геном α -(1,3)-
 галактозилтрансферазы 253–254
 свиньи, доноры органов 253–254
 связывание железа 99
 — лиганда, высокопроизводительный ана-
 лиз 202–209
 секвенирование ДНК 51, 53
 — аннотирование генома 54–57
 — метод дробовика 51, 53
 — — терминаторов 49, 50
 селекция, трансформированные клетки
 233, 233
 сельскохозяйственное производство тера-
 певтических белков 197
 серийный анализ экспрессии генов
 (SAGE) 63, 64–65
 серповидноклеточная анемия 97, 123, 144
 — — диагностика 27, 28
 — — мышинная модель 250
 сиаловой кислоты остатки 194, 193–194
 сибирская язва 95; *см. также* *Bacillus*
anthracis
 сиквенсная “картинка” 54
 сиквенсный ярлык (маркерная последова-
 тельность, (STS) 45, 48–49
 синдром токсического шока 103

система секреции, тип III 99
 скрининг, библиотеки 20
 — виртуальный (*in silico*) 217–218
 — высокоэффективный 202–209, 206–207
 — иммунологический 21
 — проб для сиквенса 62–63
 — сиквенс-специфический 20
 — функциональный 21
 слабые” метаболитаторы 141
 слитые белки, лечение рака 165, 166
 — — производство биофармацевтических
 препаратов 189–190
 случайная амплификация полиморфной
 ДНК (RAPD) 96–97
 “снимки” *см.* однонуклеотидные полимор-
 физмы
 сонная болезнь 113, 115
 социальные проблемы, генетическое тес-
 тирование 143–144
 проект “Геном человека” 40–41
 СПИД, ВИЧ инфекция 88, 89, 95
 спинномозжечковая атаксия 1 типа 249
 спроектированные дети 226
 сравнение последовательностей 58–62
 сравнительная геномика 60, 63
 — — гены рака 154
 — — инфекционные агенты 100–101, 102,
 103
 сравнительная геномная гибридизация
 (CGH) 153, 154
 средства биологической войны 92
 стандарты качества, биофармацевтические
 препараты 191, 192
 старение, клетка 166
 статмин 69, 76, 157–158
 стволовые клетки 250–251, 251
 — — взрослых 251
 — — клонирование и 252
 — — эмбриональные, *см.* эмбриональные
 стволовые клетки (ES)
 стоимость производства биофармацевти-
 ческих препаратов 197
 столбняк 91
 страхование, генетическое тестирование
 143–144
 стресс, риск возникновения рака 149
 стрептококки, *Streptococcus* группы А 103
 структура белка, анализ 34, 70
 — — базы данных 58, 59, 59–60, 62, 73–74
 — — классификация 60
 — — сравнительный анализ 58–60, 61–62

- — трехмерная 217–218
- структура и активность, соотношение (SARs) 201
- судебная медицина микробная 95
- суперфолды 60
- сходства поиск 58–61
- сцинтилляционный анализ близкого расстояния (SPA) 203, 203, 204
- сыворотка в средах для культивирования клеток 182
- зародышей телят 182, 195
- Celera Genomics 51

- Такрин 222, 223
- талассемия 97, 123
- диагностика 27, 28
- тандемные повторы, варьирующие по числу 127, 127
- теломераза 166
- тельца включения 188, 190
- терапевтические белки 29–31; см. также моноклональные антитела
- — альтернативные системы производства 197–198
- — биотерапия рака 164–166
- — моногенные болезни 128, 129
- — очистка 188–191, 190
- — примеры 170, 170–171
- — производство 29–30, 184–185
- — стандарты качества 192
- — факторы, влияющие на эффективность действия 191–195
- технологические достижения 15–16
- технология рекомбинантных ДНК 16–26
- — — применение в медицине 26–32
- технология экспрессии *in vivo* (IVET) 108–110, 109
- тилозин 219
- тип III системы секреции 99
- типирование патогенов в судебной медицине 96
- типы “метаболизаторов” 141–142
- токсикогеномика 221–223, 223
- токсины бактериальные 99, 99
- присоединенные к антителам (иммуно-токсины) 165, 176
- RTX 99, 99
- трансгенные животные, производство терапевтических белков 197–198, 197
- — как доноры органов 253–254
- трансгенные мышцы 247–248, 250
- трансгенные растения 197–198, 197
- трансдифференциация 251
- трансдукция 230
- транскриптом 62
- транскриптомика 39, 62–69; см. также микрочипы; ср. протеомика 69
- применение 67–69
- скрининг проб для сиквенса 62–63
- транскрипционная карта 33
- трансплантация органов 253–254
- трансфекция, ДНК 232–234
- трансформированные клетки 181
- трипаносомоз американский 113
- африканский 113, 115
- трипсином гидролиз, виртуальный 73
- триптические пептиды 73
- триптофан-декарбоксилаза (TDC) 163, 163
- туберкулез, штаммы для вакцинации 102
- Тэя–Сакса болезнь 123, 249
- тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID) 129–130
- — — дефицит аденозиндезаминазы (ADA) 235–237, 236
- — — X-сцепленный 237, 237

- Укладка (фолд), типы (группы) 60
- ультрафильтрация 186–187
- устойчивость организма-хозяина к инфекции 97
- участки, определяющие комплементарность (CDR) 172, 174
- — — микрочипы 63, 66
- — — экспрессионная библиотека 21

- Фаговый дисплей для анализа белковых взаимодействий 77, 78
- — создание человеческих антител 174–175
- факторы вирулентности бактерий 97–100
- — грибов 112
- — мишени для новых антибиотиков 108–112
- фамцикловир 117
- фармакогеномика 43, 141–142, 142
- фармакокинетика, новое лекарство 199
- фарнезилтрансферазы ингибиторы 162
- ферментаций серия 180, 180
- ферментация, промышленная 176–180

ферментеры, животные клетки 183–184, 183

— микроорганизмы 177, 178, 143

ферменты, используемые для манипуляций с ДНК 16, 16

— модифицирующие ДНК 16

фетальный гемоглобин, наследственная персистенция 123

физическая карта, опорная (эталонная), геном человека 48–49, 49, 51

физическое картирование 45–46

физостигмин 222, 223

фимбрии (пили типа IV) 98–99

фингерпринтинг масс пептидов 73, 75

фингерпринтирование с помощью эндонуклеаз рестрикции 47, 47

флавопиридол 162

Флеминг Александр 15

фомивирсен 240

фосфоимиджер 24

фрагмент константного участка, Fc 173

фрагменты антиген-связывающие, Fab 173

функциональная геномика 33–34, 67–80

— — гены рака 153–155

— — определение 39

функциональный клеточный анализ 205, 206–207, 208

Fugu rubripes 52

Хантингтона болезнь (БХ) 123, 211–212

химический биосинтез 220

хиимерная мышь 247–248

хиимерные антитела 174–175

хиимерные вставки 46

химиотерапевтические агенты 160–164

— — разрабатываемые, специфичные к мишени 161–162, 162

— — синтез 162–164

хирургия, лечение рака 158

холистический подход 32

хроматография 73

— аффинная 76, 77

— многомерная 73

хромосомные аномалии 121

хромосомы, картирование генов 131

— нестабильность 152

Центрифуги с непрерывным потоком 186–187, 187

центрифугирование 186–187

цервикальный рак 147

цеце муха 115

циклин-зависимые киназы (CDK) 151–152, 155

циклины 151

циклооксигеназа-2 76

цитокины, присоединенные к антителам 166, 176

цитомегаловирусная инфекция 119, 240

Частота рекомбинации 42

человеческие антимышинные антитела (HAMAs) 174

человеческие антихимерные антитела (ЧАХА, *англ.* НАСА)) 174

человеческий хорионный гонадотропин 156

— — — геном 52, 61

— — — программы мутагенеза 83

— — — РНК-интерференция 241

червь нематода, *Caenorhabditis elegans* 33, 34, 246

— филяриозный, *Onchocerca volvulus* 116

чистота биофармацевтических препаратов 191–195, 192

Шапероны 190

шариковые микроносители 184

Щелочная фосфатаза 16

Эбола лихорадка 91

экспансии (увеличение числа) тринуклеотидных повторов (триплетные повторы) 123, 211, 249

экспрессионная библиотека 21

экспрессионная протеомика 69, 70–76

— — биотехнологические основы 70–73

— — применение 75–76

экспрессионные системы, крупномасштабное производство 184–186

экспрессия гена

— — анализ 23, 33

— — глобальный анализ 62

— — изменение 23, 34

— — профили 62–69

— — токсикогеномика 221–223

- электроспрей-ионизация (ЭСИ) 73
 электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ, *англ.* PAGE) 20, 72
 — — — с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ, SDS-PAGE) 72, 72
 эмбриональные стволовые клетки (ES) 250–251
 — — — трансфекция зародышевых клеток мышей 247–248
 эмфизема, наследственная 123
 эндонуклеазы рестрикции 16
 энтерококки, устойчивые к ванкомицину (VREs) 101
 эпигенетические модификации 151, 167
 эпидемиология молекулярная 95–97
 эпидермальный фактор роста (ЭФР, *англ.* EGF)
 — — — крупномасштабное производство 188
 — — — сигнальный путь 76–77, 155
 эпитопы 173
 эритромицин 219
 эритропоэтин 194–195
 эрлифтный ферментер 183, 183
 этидийбромид 20
 этические проблемы
 — — генетическое тестирование 143–153
 — — геновая терапия 226
 — — “Геном человека”, проект 40–41
 — — клонирование человека 252–253
 эффект Кребтра 186
 эффективность биофармацевтических препаратов 191–195
 Юридические аспекты, проект “Геном человека” 40–41
 Ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) 76
 ядерный магнитный резонанс (ЯМР) 217

Латинские названия и английские сокращения

- 17AAG, лекарственный препарат 162
 ADA, *см.* аденозиндезаминаза
 AFLP, *см.* полиморфизм длины амплифицированных фрагментов 96, 97
Arabidopsis thaliana 52
 AZT, *см.* азидотимидин, зидовудин
Bacillus anthracis 95, 100
 BACs, *см.* бактерии, искусственные хромосомы
 BCG, *см.* вакцина, бациллы Кальметта–Герена (BCG)
 BR96-DOX 166
Campylobacter 90
Catharanthus roseus 162–163, 163
Cryptococcus neoformans 88
 Dicer, нуклеаза 241, 242
 DIGE, *см.* дифференциальный гель-электрофорез
Drosophila melanogaster 33–34, 246
 EGF, *см.* эпидермальный фактор роста (ЭФР)
Escherichia coli 52
 EST, *см.* маркеры экспрессируемых последовательностей
 Fab, фрагменты антиген-связывающие 173
 Fc, фрагменты 173
 GeneChips 65, 67
 GFP, *см.* зеленый флуоресцентный белок
 GMP, *см.* международный стандарт качества GMP
 HAART, *см.* высокоактивная антивирусная терапия
Haemophilus influenzae 52
Helicobacter pylori 97
 Herzyme, рибозим 130, 241
Legionella pneumophila 90
 MALDI (МАЛДИ), *см.* матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
Methanococcus jannaschii 52
Mycobacterium bovis, вакцина BCG 102, 105
Mycoplasma genitalium 52

NNRTI, см. ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

Onchocerca volvulus 116

PAGE, см. электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ)

PAI, см. патогенности островки

PFGE, см. гель-электрофорез в пульсирующем поле

Pichia pastoris 185

Plasmodium falciparum, малярийный паразит 52, 115

RAPD, см. случайная амплификация полиморфной ДНК

RNAi, см. РНК-интерференция

Saccharomyces cerevisiae 33, 34, 52

SAGE, см. серийный анализ экспрессии генов

Salmonella 98, 101

Salmonella typhimurium 104–105

SAR см. структура и активность, соотношение

SCID см. тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID)

Shigella 101–102

siRNAs, см. малые интерферирующие РНК

SNPs, см. однонуклеотидные полиморфизмы

SPA, см. сцинтилляционный анализ близкого расстояния

SPR, см. поверхностный плазмонный резонанс

Staphylococcus aureus, (MRSA), метициллин-устойчивый золотистый стафилококк 103

Streptococcus группы А 103

STS, см. сиквенсный ярлык (маркерная последовательность),

TOF, см. времяпролетный детектор

Vibrio cholerae 105

Wigglesworthia glossinidia 115

Wolbachia 116

YAC, см. дрожжевая искусственная хромосома

Yersinia 98

Оглавление

Предисловие редакторов русского издания	5
Предисловие	10
Благодарности	13
Глава 1. Биотехнология и геномика. Медицинский аспект	15
Введение	15
Технология рекомбинантных ДНК	16
Дополнение 1-1 Основные ферменты, используемые для манипуляций с ДНК	16
Метод молекулярного клонирования	17
Дополнение 1-2 Гель-электрофорез	20
Идентификация и клонирование специфических генов	20
Функциональная характеристика клонированных генов	23
Дополнение 1-3 Зонды для гибридизации на основе нуклеиновых кислот (НК-зонды для гибридизации)	24
От рекомбинантной ДНК к молекулярной медицине	26
Использование ДНК-последовательностей в качестве инструментов диагностики	26
Получение терапевтических белков	27
Генная медицина	31
Модели болезней	31
Влияние геномики на медицину	32
Новая молекулярная медицина	35
Об этой книге	36

Дополнительная литература	37
Глава 2. Основные принципы геномики	38
Введение	38
Новые достижения: проект «Геном человека»	38
Дополнение 2-1 Что такое геномика?	39
Дополнение 2-2 Геномы модельных организмов как первоначальные задачи проекта «Геном человека»	40
Дополнение 2-3 Этические, юридические и социальные аспекты (ELSI) проекта «Геном человека»	40
Революция в генетическом картировании	42
Дополнение 2-4 Вариации в геноме человека	42
Революция в физическом картировании	45
Дополнение 2-5 Опорная STS-карта генома человека	48
Стратегия секвенирования	49
Дополнение 2-6 «Черновые» варианты и окончательные последовательности	54
Аннотирование генома	54
Перспективы: функциональная геномика	57
Сравнение последовательностей. Сравнительная геномика	58
Дополнение 2-7 Стандартизованная структурная и функциональная классификация белков	60
Транскриптомика. Глобальный анализ мРНК	62
Дополнение 2-8 Производство точечных и олигонуклеотидных микрочипов	65
Протеомика. Глобальный анализ белков	69
Биотехнологические основы разделения протеомов	70
Дополнение 2-9 Белковые чипы	71
Характеристика белков с помощью масс-спектрометрии	73
Применение экспрессионной протеомики	75
Биотехнологические основы протеомики взаимодействий	76
Мутационная геномика	80
Дополнительная литература	83
Глава 3. Геномика и ее роль в лечении инфекционных заболеваний ...	85
Микроорганизмы, вызывающие заболевания	85
Откуда появляются новые болезни?	89
Идентификация возбудителей болезни	91
Дополнение 3-1 Средства биологической войны	92

Дополнение 3-2 Типирование патогенов в судебной медицине	95
Молекулярная эпидемиология	95
Устойчивость организма-хозяина к инфекции	97
Понятие бактериальной патогенности	97
Островки патогенности	100
Сравнительная геномика и пластичность генома	100
Дополнение 3-3 Геномные вариации штаммов туберкулезной вакцины	102
Дополнение 3-4 Очерки истории происхождения метициллин-устойчивого штамма <i>Staphylococcus aureus</i> (метициллин-устойчивого золотистого стафилококка, MRSA) и эпидемия синдрома токсического шока	103
Борьба с инфекционными заболеваниями	104
Новые подходы к вакцинированию	104
Геномика и разработка новых антибактериальных препаратов	107
Борьба с грибковыми инфекциями	112
Успехи в лечении протозойных инфекций	112
Дополнение 3-5 Жизненный цикл малярийного паразита	114
Разработка противовирусных препаратов	116
Дополнение 3-6 Высокоактивная антивирусная терапия (ВААВТ, или <i>англ.</i> HAART) при лечении СПИДа	119
Дополнительная литература	120
Глава 4. Исследование и лечение генетических заболеваний	121
Типы генетических заболеваний	121
Диагностика моногенных болезней	122
Лечение моногенных болезней	128
Дополнение 4-1 Рибозимы	130
Поиск генов, ответственных за моногенные болезни, и выявление их функций	131
Позиционное клонирование	131
Метод генов-кандидатов	133
Дополнение 4-2 Последовательность генома мыши и ее значимость для изучения болезней человека	133
Анализ полигенных болезней	135
Безмодельный (непараметрический) анализ сцеплений	135
Дополнение 4-3 Связь между диабетом I типа и ГКГ	136
Картирование неравновесных сцеплений	137
Гаплотипы	138

Главный комплекс гистосовместимости	138
Индивидуальные реакции на лекарства (фармакогеномика)	141
Дополнение 4-4 Социальные и этические проблемы	143
Дополнительная литература	145
Глава 5. Диагностика и лечение рака	146
Введение	146
Молекулярные основы рака	147
Дополнение 5-1 Рак как эволюционный процесс	148
Дополнение 5-2 Молекулярный контроль клеточной пролиферации	151
Роль геномики в изучении рака	153
Новые методы диагностики рака	155
Новые подходы к лечению рака	158
Радиотерапия	159
Химиотерапия	160
Биотерапия	164
Новые терапевтические мишени	166
Дополнительная литература	168
Глава 6. Крупномасштабное производство биофармацевтических препаратов	169
Краткий обзор	169
Дополнение 6-1 Названия моноклональных антител	172
Производство моноклональных антител	172
Дополнение 6-2 Человеческие антитела, полученные с помощью фагового дисплея	175
Радиоиммунотерапия и диагностическая визуализация	175
Другие модифицированные антитела	176
Крупномасштабное культивирование микроорганизмов	176
Крупномасштабное культивирование животных клеток	180
Дополнение 6-3 Иммортиализованные клетки в генетических исследованиях	181
Экспрессионные системы	184
Дальнейшие производственные процессы	186
Генетические манипуляции для облегчения процедур очистки биофармацевтических препаратов	189
Качество биофармацевтических препаратов	191

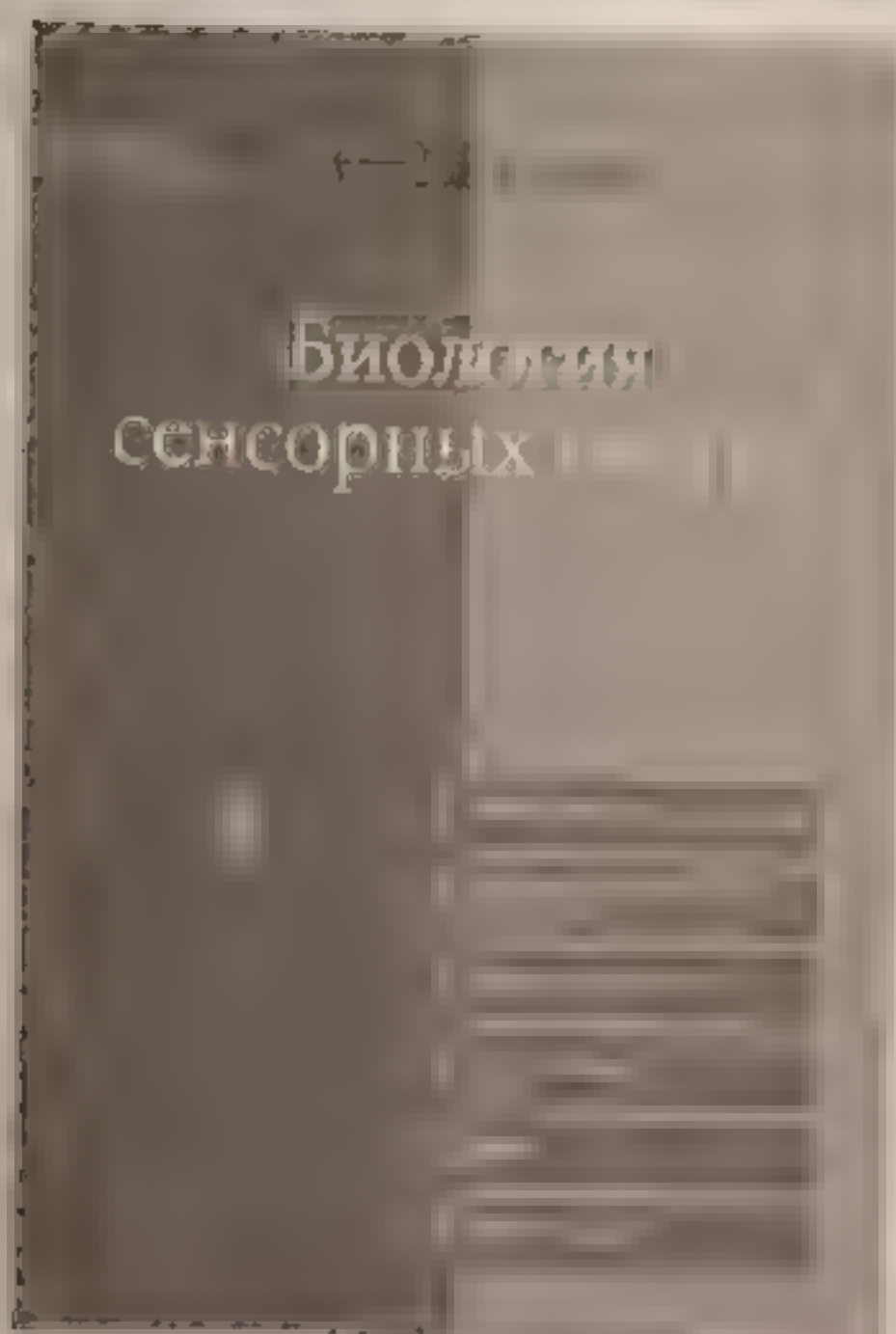
Дополнение 6-4 Использование лектиновых микрочипов для анализа гликозилирования биофармацевтических препаратов	193
Международный стандарт качества GMP	195
Дополнение 6-5. Термины, используемые при производстве биофармацевтических препаратов	196
Альтернативные системы производства	197
Дополнительная литература	198
 Глава 7. Геномика и создание новых лекарственных препаратов	199
Введение. Как разрабатывают лекарства?	199
Высокоэффективный скрининг	202
Дополнение 7-1 Сцинтилляционный анализ близкого расстояния	204
Подтверждение действенности препарата и животные модели	209
Дополнение 7-2 Примеры лекарственных мишеней, подтвержденных в нокаутных мышинных моделях	211
Комбинаторная химия	212
Динамические комбинаторные библиотеки	216
Виртуальный скрининг	217
Комбинаторный биосинтез и химический биосинтез	218
Метаболизм лекарств	221
Токсикогеномика	221
Дополнительная литература	223
 Глава 8. Генная и клеточная терапия	225
Введение	225
Дополнение 8-1 Этические аспекты применения генной терапии	226
Генная терапия	226
Пути доставки генов	228
Механизмы доставки генов	229
Дополнение 8-2 Свойства вирусных векторов для доставки генов	230
Примеры лечения заболеваний	234
Лекарства на основе нуклеиновых кислот	239
Антисмысловые препараты	240
Лекарства на основе рибозимов	240
Возможности малых интерферирующих РНК	241
Аптамеры	242
Генная терапия инфекционных заболеваний: ВИЧ	243

ДНК-вакцины	244
Модели болезней	245
Модели моногенных болезней	246
Дополнение 8-3 Перенос генов мышам	248
Модели комплексных болезней	250
Клеточная терапия	250
Стволовые клетки и клонирование	252
Дополнение 8-4 Этические аспекты клонирования человека	252
Трансплантация органов	253
Дополнительная литература	254
 Предметный указатель	 256
 Латинские названия и английские сокращения	 270

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ВУЗОВ

■ БИОЛОГИЯ

ИМЕЕТСЯ В ПРОДАЖЕ



Смит К. Ю. М. *Биология сенсорных систем* / К. Ю. М. Смит ; пер. с англ. — 2005. — 583 с. : ил.

Книга посвящена строению и работе органов чувств человека и животных. Помимо нейробиологических, рассматриваются эволюционные, молекулярные, гистологические, анатомические, а также философские аспекты. Показано глубокое единство животного мира.

Изучение сенсорных систем животных позволит освободиться от антропоцентризма и «увидеть» окружающий мир иными органами чувств.

Приведенная в книге библиография и ссылки на интернет-сайты охватывают период от эпохи Аристотеля до начала нашего века.

Для учащихся старших классов и студентов, изучающих биологию и поведение животных, а также специалистов, занимающихся моделированием сложного поведения или интеллекта.



ИЗДАТЕЛЬСТВО

«БИНОМ

Лаборатория знаний»

125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3
Телефон: (499) 157-5272
e-mail: Lbz@aha.ru, <http://www.Lbz.ru>
Оптовые поставки:
(495) 174-7616, 171-1954, 170-6674

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ВУЗОВ

■ БИОЛОГИЯ

ГОТОВИТСЯ К ИЗДАНИЮ



Бурместер Г.-Р. **Наглядная иммунология** / Г.-Р. Бурместер, А. Пецутто ; пер. с англ. — 2007. — 320 с. : ил. — (Наглядная медицина).

В справочном издании, написанном немецкими специалистами, в наглядной форме излагаются основы иммунологии, методы лабораторной диагностики и основы клинической иммунологии (объясняется связь теоретических принципов и клинических аспектов; рассмотрены все известные заболевания, имеющие иммунную природу). Книга построена как атлас, где на каждом развороте помещена иллюстрация, необходимые для темы объяснения, определения, понятия. Несмотря на краткость изложения, наиболее трудные для понимания вопросы изложены детально и четко. В приложении представлены критерии для диагностики иммунных заболеваний, приведен полный перечень известных кластеров дифференцировки, а также список наиболее важных для иммунологии цитокинов. В кратком словаре разъясняются основные иммунологические термины. Имеется предметный указатель.

Для студентов и преподавателей, а также для специалистов.



ИЗДАТЕЛЬСТВО

«БИНОМ
Лаборатория знаний»

125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3
Телефон. (499) 157-5272
e-mail: Lbz@aha.ru, <http://www.Lbz.ru>
Оптовые поставки:
(495) 174-7616, 171-1954, 170-6674

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ВУЗОВ

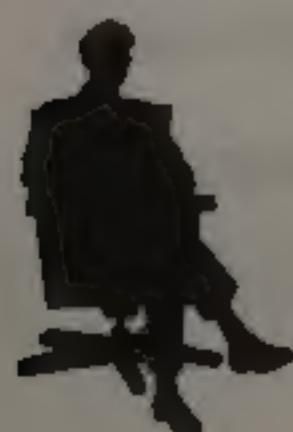
■ БИОЛОГИЯ

ГОТОВИТСЯ К ИЗДАНИЮ

Журавлев А. И. **Основы физики и биофизики** / А. И. Журавлев, А. С. Белановский, В. Э. Новиков и др. — 2-е изд., испр. — 2007. — 384 с. : ил.

В учебнике гармонично связаны классическая физика и ее практические аспекты, широко используемые в современной медицине, ветеринарии, биотехнологии и зоотехнике. Рассмотрены законы термодинамики. Проанализированы явления переноса в живом организме. Даны необходимые сведения о кинетике переноса. Рассмотрены основные виды движения твердых тел и их механические свойства. Необходимое внимание уделено биореологии. Приведены основные сведения из гидродинамики, теории электричества и магнетизма, а также акустики, относящиеся к процессам, протекающие в живом организме. Рассмотрены физика свободных радикалов и электронных возбужденных состояний и их значения для биологии и медицины.

Настоящий учебник написан в соответствии с ГОСом и учебными программами для студентов ветеринарных и зоотехнических специальностей.



ИЗДАТЕЛЬСТВО
«БИНОМ
Лаборатория знаний»

125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3
Телефон: (499) 157-5272
e-mail: Lbz@aha.ru, <http://www.Lbz.ru>
Оптовые поставки:
(495) 174-7616, 171-1954, 170-6674

УЗОВ

Журавлев,
д., испр. —

и ее прак-
й медицине,
законы тер-
м организме.
Рассмотрены
ие свойства.
ны основные
изма, а также
м организме.
озбужденных

ебными про-
циальностей.

Аэропорта, д. 3

/www.Lbz.ru

д. 170-6674

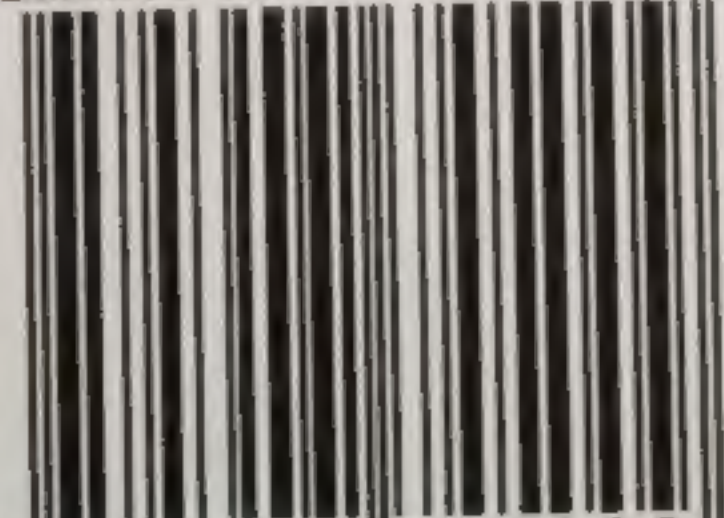
В истории биологических исследований можно выделить две эпохи: новейшая эра массированного анализа структуры геномов и предшествующее ей время.

Успехи в понимании сложнейших систем геномов, клеточных структур и систем сигнализации уверенно привели науку в различные прикладные области и, что особенно ценно, в медицину.

В этой книге дана всесторонняя оценка применения технологии рекомбинантной ДНК и геномики в медицине.

Для студентов, изучающих молекулярную биологию, генную инженерию, геномику, молекулярную медицину, а также для научных работников.

ISBN 978-5-94774-500-9



9785947745009

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛЫ
МЕДИЦИН

